



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**  
**Escola de Ciências e Tecnologia**

**Mestrado em Bioquímica**

**Dissertação**

**Caracterização fenotípica de *Petromyzon marinus* L. em fase de migração reprodutiva em bacias hidrográficas portuguesas, com recurso a perfis de composição lipídica e de expressão de enzimas hepáticos reguladores do metabolismo lipídico.**

Carla Patrícia Ferreira Rosado

**Orientador:**

Prof<sup>ª</sup> Doutora Maria João Lança, Departamento de Zootecnia

**Co-orientador:**

Prof. Doutor Rui Ferreira, Departamento de Química

2010



**Mestrado em Bioquímica**

**Dissertação**

**Caracterização fenotípica de *Petromyzon marinus* L. em fase de migração reprodutiva em bacias hidrográficas portuguesas, com recurso a perfis de composição lipídica e de expressão de enzimas hepáticos reguladores do metabolismo lipídico.**

Carla Patrícia Ferreira Rosado

**Orientador:**

Prof<sup>a</sup> Doutora Maria João Lança, Departamento de Zootecnia

**Co-orientador:**

Prof. Doutor Rui Ferreira, Departamento de Química



## AGRADECIMENTOS

Para este trabalho contribuíram várias pessoas, sendo sempre difícil nomear todos os que directa ou indirectamente nele colaboraram. Porém, quero manifestar a minha particular gratidão às pessoas e instituições que directamente nele participaram.

À Prof<sup>a</sup>. Doutora Maria João Lança do Departamento de Zootecnia da Universidade de Évora e ao Prof. Doutor Rui Ferreira do Departamento de Química da Universidade de Évora, o meu especial agradecimento pelo empenho e orientação prestados durante a realização deste trabalho e por todas as sugestões e críticas efectuadas.

Ao Prof. Doutor Pedro Raposo de Almeida do Departamento de Biologia da Universidade de Évora por me ter aceite como participante neste projecto, o meu muito obrigado.

Prof<sup>a</sup>. Doutora Isabel Alves-Perreira do Departamento de Química pelo seu apoio e dedicação, o meu obrigado.

Aos meus colegas de laboratório da Universidade de Évora, em especial à Maria e à Sara pelo apoio e amizade.

Aos funcionários da Universidade de Évora que de forma directa ou indirecta contribuíram para a instalação e condução dos ensaios e para a realização das análises.

À minha família e, de forma muito especial, aos meus pais e também a todos os meus amigos, o meu profundo reconhecimento pelo encorajamento, compreensão e apoio prestados no decurso deste trabalho.



## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	III
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VII
ABREVIATURAS E NOMENCLATURA DE ENZIMAS .....	IX
RESUMO .....	XIII
ABSTRACT .....	XV
1. PROBLEMA E OBJECTIVOS.....	- 1 -
1.1. Problema.....	- 1 -
1.2. Objectivos .....	- 2 -
2. INTRODUÇÃO .....	- 5 -
2.1. A Lampreia Marinha .....	- 5 -
2.2. Locais de Captura em Portugal .....	- 8 -
2.3. Lípidos em peixes – influências ambientais .....	- 11 -
2.4. Enzimas envolvidos na regulação do metabolismo lipídico.....	- 13 -
3. METODOLOGIA.....	- 19 -
3.1. Estratégia .....	- 19 -
3.2. Procedimento Experimental.....	- 21 -
3.2.1. Material biológico.....	- 21 -
3.2.2. Local de captura e eutanásia .....	- 21 -
3.2.3. Determinação dos parâmetros biométricos e recolha de fígado.....	- 21 -
3.2.4. Determinação do perfil em ácidos gordos .....	- 21 -
3.2.4.1. Extracção de lípidos totais .....	- 21 -
3.2.4.2. Separação de lípidos neutros e lípidos polares .....	- 22 -
3.2.4.3. Saponificação e metilação .....	- 23 -
3.2.4.4. Análise cromatográfica.....	- 23 -
3.2.4.5. Identificação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos .....	- 23 -
3.2.5. Fraccionamento celular dos tecidos .....	- 24 -
3.2.5.1. Homogeneização e preparação da fracção microssomal .....	- 24 -
3.2.5.2. Preparação do sobrenadante pós-16000 g .....	- 25 -
3.2.6. Análise quantitativa das fracções sub-celulares.....	- 25 -
3.2.6.1. Determinação da concentração de proteína total .....	- 25 -
3.2.6.2. Determinação da concentração do Hemo .....	- 26 -
3.2.7. Determinação das actividades enzimáticas .....	- 26 -
3.2.7.1. Acetil-CoA Carboxilase .....	- 26 -

3.2.7.2. Triacilglicerol Lipase.....	- 27 -
3.2.7.3. Glucose-6-fosfato desidrogenase.....	- 27 -
3.2.7.4. NADPH citocromo c (P450) redutase .....	- 28 -
3.2.7.5. Alongases e insaturases .....	- 28 -
3.3. Diagrama do trabalho .....	- 29 -
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	- 33 -
4.1. Caracterização dos animais.....	- 33 -
4.2. Determinação do perfil em ácidos gordos.....	- 34 -
4.3. Análise quantitativa das fracções sub-celulares.....	- 38 -
4.3.1. Perfil de actividades enzimáticas .....	- 38 -
4.3.2. Alongases e insaturases e funções do retículo endoplasmático .....	- 40 -
5. CONCLUSÕES .....	- 43 -
6. BIBLIOGRAFIA .....	- 45 -
Anexos .....	- 53 -



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Lampreia marinha .....	- 5 -
Figura 2 – Aspecto do disco oral de uma lampreia marinha . ....	- 6 -
Figura 3 – Distribuição geográfica da lampreia marinha .....	- 7 -
Figura 4 – Ciclo de vida da lampreia marinha.....	- 7 -
Figura 6 – Metabolismo dos triacilgliceróis. ....	- 14 -
Figura 7 – Metabolismo de lípidos .....	- 15 -
Figura 8 – Formação de malonil-CoA .....	- 15 -
Figura 9 - Fase oxidativa da via das pentoses fosfato. ....	- 15 -
Figura 10 – Via de activação de alongases do RE .....	- 16 -
Figura 11 – Via de activação de insaturases do RE .....	- 16 -
Figura 12 – Parceiros redox do enzima NADPH cit c (P450) redutase .....	- 17 -
Figura 13 – Traçado de um cromatograma padrão.....	- 24 -
Figura 14 – Actividade enzimática ACC (A), G6PD (B) e TGL (C) .....	- 39 -
Figura 15 – Actividade enzimática alongase .....	- 40 -
Figura 16 – Actividade enzimática insaturase.....	- 41 -
Figura 17 – Concentração do hemo da fracção microssomal e actividade CPR .....	- 42 -
Figura A1 – Representação gráfica da curva de calibração das proteínas .....	- 54 -
Figura A2 – Representação gráfica da curva de calibração de fosfato. ....	- 54 -
Figura B1 – Curvas de reacção ACC.....	- 55 -
Figura C1 – Curvas de reacção TGL .....	- 56 -
Figura D1 – Curvas de reacção G6PD .....	- 57 -
Figura E1 – Curvas de reacção CPR.....	- 58 -

## INDICE DE QUADROS

Quadro 1 - Condições da extracção dos lípidos. ....	- 22 -
Quadro 2 – Características biométricas dos animais em estudo .....	- 33 -
Quadro 3 – Ácidos gordos identificados (neutros e polares).....	- 35 -
Quadro A1 – Análise de variância (ANOVA I).....	- 59 -
Quadro A2 – Análise de variância (ANOVA I).....	- 60 -

## ABREVIATURAS E NOMENCLATURA DE ENZIMAS

✓ AC	Adenilato ciclase (EC 4.6.1.1)
✓ ACC	Aceti-CoA carboxilase (EC 6.4.1.2)
✓ ARH	Administração da região hidrográfica
✓ ASE	Extracção por solvente a alta pressão
✓ ATP	Adenosina trifosfato
✓ BF <sub>3</sub>	Trifluoreto de boro
✓ BHT	Di-ter-butil metil fenol
✓ BSA	Albumina sérica bovina
✓ cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
✓ CBR	NADH citocromo b <sub>5</sub> redutase (EC 1.6.2.2)
✓ CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
✓ CPR	NADPH citocromo c (P450) redutase (EC 1.6.2.4)
✓ CT	Comprimento total
✓ DHA	Ácido docosahexaenóico
✓ DHCR7	7-dihidrocolesterol redutase (EC 1.3.1.21)
✓ EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
✓ EGTA	Ácido etilenoglicoltetracético
✓ EPA	Ácido eicosapentaenóico
✓ FAD	Dinucleótido de flavina e adenina
✓ FID	Detector de ionização por chama
✓ FMN	Mononucleótido de flavina
✓ G6PD	Glucose-6-P desidrogenase (EC 1.1.1.49)
✓ GC	Comatografia gasosa
✓ GTP	Guanosina trifosfato
✓ HCl	Ácido clorídrico

✓ Hepes	Ácido N-2-hidroxietil-1-piperazinaetanosulfónico
✓ HUFA	Ácidos gordos altamente insaturados
✓ INSAT	Insaturados
✓ KCl	Cloreto de potássio
✓ KF	Fluoreto de potássio
✓ LN	Lípidos neutros
✓ LP	Lípidos polares
✓ LT	Lípidos totais
✓ $MgCl_2$	Cloreto de magnésio
✓ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Cloreto de magnésio hexahidratado
✓ MUFA	Ácidos gordos monoinsaturados
✓ NaCl	Cloreto de sódio
✓ NAD(P)	Dinucleótido de nicotinamida e adenina fosfato (forma oxidada)
✓ NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
✓ NADPH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina fosfato (forma reduzida)
✓ $NaHCO_3$	Hidrogenocarbonato de sódio
✓ NaOH	Hidróxido de sódio
✓ p/v	Peso por volume
✓ Pi	Fosfato inorgânico
✓ PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
✓ PT	Peso total
✓ PUFA	Ácidos gordos polinsaturados
✓ RE	Retículo endoplasmático
✓ SAT	Saturados
✓ SDS	Duodecilssulfato de sódio
✓ SE	Erro padrão
✓ SFA	Ácidos gordos saturados

- ✓ TGL                      Triacilglicerol lipase (EC 3.1.1.3)
- ✓ Tris                     Tris(hidroximetil)aminometano
- ✓  $\delta 6$                     Insaturase Delta 6 (EC 1.14.19.3)
- ✓  $\delta 9$                     Insaturase Delta 9 (EC 1.14.19.1)



**Caracterização fenotípica de *Petromyzon marinus* L. em fase de migração reprodutiva em bacias hidrográficas portuguesas, com recurso a perfis de composição lipídica e de expressão de enzimas hepáticos reguladores do metabolismo lipídico.**

## **RESUMO**

Carla Patrícia Ferreira Rosado (2010). **Caracterização fenotípica de *Petromyzon marinus* L. em fase de migração reprodutiva em bacias hidrográficas portuguesas, com recurso a perfis de composição lipídica e de expressão de enzimas hepáticos reguladores do metabolismo lipídico.** Tese de Mestrado (M.J. Almeida e R. Ferreira, Orientadores) Escola de Ciências e Tecnologia. Universidade de Évora, Évora, Portugal.

O alvo principal deste trabalho foi caracterizar fenotipicamente *Petromyzon marinus* L. em fase de migração reprodutiva de quatro bacias hidrográficas portuguesas, com base no perfil em ácidos gordos de lípidos neutros e polares hepáticos, bem como, actividades enzimáticas reguladoras da biossíntese, disponibilização e modificação de lípidos. Os resultados mostraram que o perfil de lípidos neutros, bem como, as actividades enzimáticas ACC, G6PD e TGL permitiram subdividir as lampreias em dois sub-grupos: (i) Tejo e bacias a norte deste e (ii) Guadiana, embora no segundo caso, o grupo (i) possa por vezes, ser subdividido em dois novos sub-grupos: (a) Vouga e Tejo segregado do Minho ou (b) Minho e Tejo segregados do Vouga. Níveis baixos de enzimas microssomais suportam a hipótese de que todos os animais se encontravam no mesmo estágio de desenvolvimento, pois não se detectaram diferenças significativas nos parâmetros analisados que indiciam involução funcional de alguns tecidos.





**Phenotypic characterization of *Petromyzon marinus*, L at beginning of its non-trophic spawning migration in Portuguese river basins, using lipid composition profiles and key enzymes expression of liver lipid metabolism.**

**ABSTRACT**

Carla Patrícia Ferreira Rosado (2010). **Phenotypic characterization of *Petromyzon marinus*, L at beginning of its non-trophic spawning migration in Portuguese river basins, using lipid composition profiles and key enzymes expression of liver lipid metabolism.** Master's thesis (M.J. Almeida e R. Ferreira, Advisers) Science and Technology Scholl, University of Évora, Évora, Portugal.

The main target of this work was to characterize phenotypically *Petromyzon marinus*, L. at beginning of its non-trophic spawning migration from four Portuguese river basins, based on hepatic fatty acid profile of neutral and polar lipids, as well as enzymatic activities that regulate lipogenesis, lipolysis and lipid modification. The results showed that neutral fatty acid profile and acetyl-CoA carboxylase, glucose-6P dehydrogenase and triacylglycerol lipase activities allowed to subdivide lampreys into two subgroups: (i) Tagus river basin and two other basins located in the north of country and (ii) Guadiana, although in the case of lipid enzymes the group (i) can sometimes be divided into two new sub-groups: (a) Vouga and Tagus segregated from Minho or (b) Minho and Tagus segregated from Vouga. Low level of microsomal enzymes supports the hypothesis that all animals were in the same developmental stage for those parameters that indicate functional involution of some tissues.



# 1. PROBLEMA E OBJECTIVOS

## 1.1. Problema

Os agnatas encontram-se representados actualmente pelas mixinas (Myxiniformes) e as lampreias (Petromyzontiformes) (Hardisty, 1971a, 1971b). A maior parte das espécies de lampreia apresentam um ciclo de vida semelhante que engloba duas fases tróficas distintas. Durante a fase larvar, os amocetes acumulam lípidos em tecidos como o hepático, renal, subcutâneo e mioseptos (Lowe, 1973). Após três a cinco anos, ocorre o período de metamorfose para juvenis pelágicos, período em que os juvenis de lampreias utilizam as reservas lipídicas acumuladas na fase larvar. As lampreias juvenis migram em direcção ao mar onde iniciam a fase parasitária do seu ciclo de vida, alimentando-se de sangue e músculo de peixes durante pelo menos 24 meses. Esta fase marinha é acompanhada pela acumulação de grande quantidade de lípidos, particularmente no tecido muscular, o principal depósito de reservas energéticas durante a posterior migração reprodutiva (Bird, 1993). No final desta fase, os adultos deixam de se alimentar, migram para os rios onde fazem os ninhos, desovam e morrem (Larsen, 1980).

Na literatura encontra-se descrito que ocorrem alterações consideráveis na composição lipídica dos tecidos durante as várias fases do ciclo de vida (Pinela, 2009; Huynh, 2007). Consequentemente, este trabalho tem como principal objectivo determinar no tecido hepático, o conteúdo e os perfis de composição em ácidos gordos de lípidos neutros e polares, bem como actividades enzimáticas reguladoras da lipogénese como a acetil-CoA carboxilase; da lipólise como a triacilglicerol lipase, insaturases do retículo endoplasmático e aquelas que estejam implicadas na mobilização de lípidos para o espaço intermembranar, tendo em vista caracterizar fenotipicamente os agnatas em estudo. Este facto obrigou à recolha de *Petromyzon marinus* L. em diferentes bacias hidrográficas portuguesas durante o seu período inicial da migração reprodutiva (Frick, 2008; Tong, 2005; Vergèresb, 1995).

## 1.2. Objectivos

### ► GERAIS

Caracterização fenotípica de *Petromyzon marinus* L. em fase de migração reprodutiva de quatro bacias hidrográficas portuguesas, com base no perfil em ácidos gordos dos lípidos neutros e polares do fígado, bem como actividades enzimáticas reguladores da biossíntese, disponibilização e modificação de lípidos.

### ► ESPECIFICOS

#### Conhecer

- O perfil em ácidos gordos dos lípidos neutros e polares do fígado
- O perfil de expressão funcional hepática dos enzimas reguladores da biossíntese, disponibilização e modificação de lípidos
- O perfil de expressão *funcional* do hemo microsomal
- A metodologia para a determinação do perfil em ácidos gordos hepáticos
- A metodologia para a determinação das actividades enzimáticas ACC, G6PD, TGL, alongases, insaturases e CPR hepáticas.
- Metodologia para obtenção de microssomas hepáticos e quantificação do hemo.
- Abordagens experimentais que permitam inferir a influência da dieta no perfil e metabolismo lipídico do fígado na lampreia marinha, no início da fase de migração reprodutiva.
- Abordagens experimentais que permitam detectar diferenças fenotípicas no fígado de lampreia marinha que permitam discriminar grupos de animais.

#### Compreender

- A relação entre perfil e metabolismo lipídico do fígado, no início da fase de migração reprodutiva.
- Como a composição lipídica e os parâmetros reguladores do seu metabolismo hepático, podem ser indicadores da influência da dieta na fase parasitária.

- Protocolos para a obtenção de fracções sub-celulares para a determinação de conteúdos e actividades enzimáticas envolvidas no metabolismo de lípidos
- Protocolos para determinação do perfil lipídico hepático de lampreia marinha
- Protocolos para determinação de actividades enzimáticas reguladoras do metabolismo lipídico hepático da lampreia marinha

#### Dar valor

- Às actividades, ACC, G6PD, TGL, alongases e insaturases CPR e conteúdo em hemo microssomal do tecido hepático de lampreia marinha

#### Aplicar

- O conhecimento do perfil em ácidos gordos dos lípidos neutros e polares do fígado, bem como as actividades lipogénicas, lipolíticas e modificadoras de lípidos como marcadores fenotípicos adequados para discriminar possíveis grupos populacionais com estratégias ecológicas idênticas.



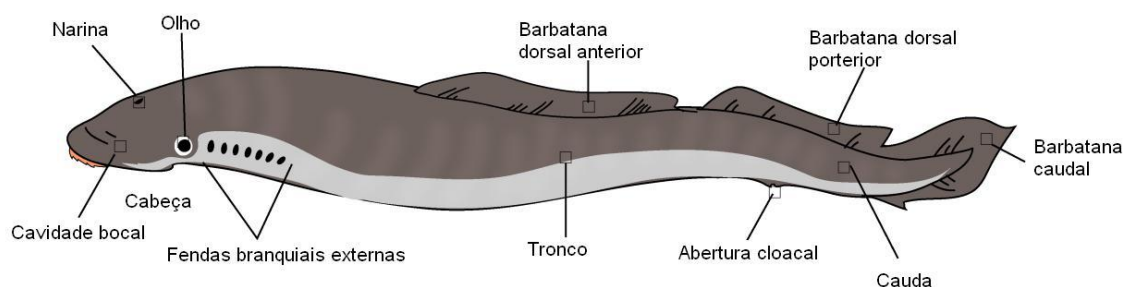
## 2. INTRODUÇÃO

Em Portugal, a lampreia marinha (*Petromyzon marinus* L.) desperta um elevado interesse devido quer à sua importância gastronómica quer económica sendo, por isso, alvo de uma intensa exploração pesqueira com fins comerciais por altura da migração reprodutora anual (Quintella, 2003). Actualmente, esta espécie encontra-se mesmo classificada como “Vulnerável” no Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal (Rogado, 2005).

Em Portugal encontram-se descritas três espécies: a lampreia-marinha (*Petromyzon marinus* Linnaeus, 1758), a lampreia-do-rio (*Lampetra fluviatilis*, Linnaeus, 1758) e a lampreia-do-riacho (*Lampetra planeri*, Bloch, 1782) (Almaça, 1990; Almaça, 1995; Almeida, 2002).

### 2.1. A Lampreia Marinha

As lampreias, juntamente com as mixinas, representam o grupo mais antigo de vertebrados, os Agnatha (Hardisty, 1971a, 1971b; LeBlanc, 1995). Este grupo caracteriza-se quer pela ausência de mandíbulas e de barbatanas pélvicas, quer pela ausência de raios dérmicos na barbatana peitoral (Kelly e King, 2001). O corpo é anguiliforme, com a parte posterior achatada lateralmente e revestido por pele fina e sem escamas muito rica em glândulas exócrinas. As lampreias marinhas podem atingir 90 ou mais centímetros de comprimento (Hardisty, 1971b). Outras características importantes são a presença de 7 fendas branquiais, barbatanas muito pouco desenvolvidas e ausência de barbatana pares (Kelly & King, 2001) (Figura 1). Pode salientar-se ainda a presença de um disco oral que funciona como ventosa e ainda várias fileiras de dentes muito fortes, que variam em forma, tamanho, posição e número consoante a espécie e, com os quais, perfuram o revestimento de escamas e permitem alcançar a carne subjacente dos peixes de que se alimentam em ambiente marinho (Kelly e King, 2001) (Figura 2).



**Figura 1** – Lampreia marinha (Adaptado de commons.wikimedia.org/.../gallery1).



**Figura 2** – Aspecto do disco oral de uma lampreia marinha (adaptado de [mfpesca.blogspot.com/2009/09/boleia.html](http://mfpesca.blogspot.com/2009/09/boleia.html)).

A lampreia marinha apresenta a seguinte taxonomia e classificação:

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Subfilo: Craniata

Super-Classe: Petromyzontomorphi

Classe: Petromyzontida

Ordem: Petromyzontiformes

Família: Petromyzontidae

Sub-Família: Petromyzontinae

Género: *Petromyzon*

Espécie: *Petromyzon marinus*

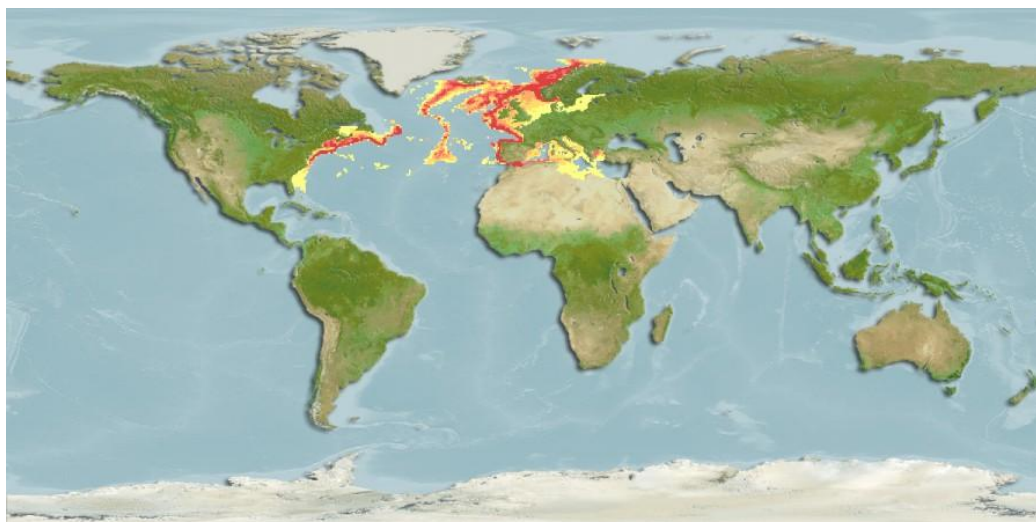
A lampreia marinha pode ser encontrada no Hemisfério Norte em ambas as costas do Oceano Atlântico (Beaulaton, 2008).

Na América do Norte, distribui-se desde o Labrador, a norte e Canadá, até à Florida, a sul bem como na costa do Golfo do México (Hardisty, 1986). No Norte da Europa a sua ocorrência é esporádica e rara, embora possa ser encontrada na Gronelândia, Noruega e Mar Báltico. Nas ilhas britânicas as populações mais significativas são as do sudoeste da Inglaterra, dos rios que drenam para o canal de Bristol e ao sul do País de Gales. No Mediterrâneo, distribui-se desde a costa da Albânia, no mar Adriático, à costa de Malta, Córsega e Sicília assim como à costa noroeste africana (Hardisty, 1986).

A nível nacional podemos encontrar lampreias marinhas nas bacias hidrográficas dos rios Minho, Lima, Cávado, Vouga, Douro, Mondego, Tejo e Guadiana (Almeida, 2002) (Figura 3).

Apesar de uma vasta distribuição pouco se sabe acerca da metamorfose, migração trófica e fase marinha parasitária desta espécie na Europa (Bird, 1994; Halliday, 1991; Nichols e Hamilton, 2004).

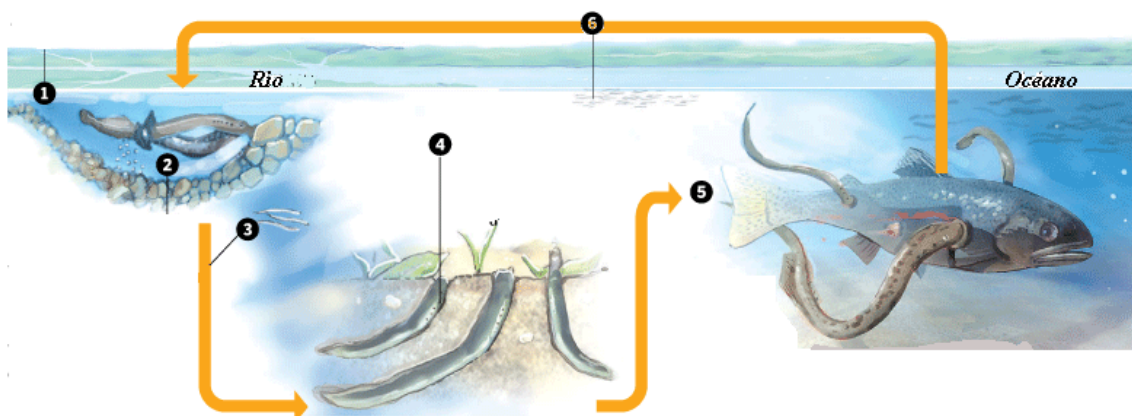




**Figura 3** – Distribuição geográfica da lampreia marinha (adaptado de [www.nbi.gov](http://www.nbi.gov)).

A lampreia marinha é diádroma, isto é, o seu ciclo biológico (Figura 4) decorre em dois meios de salinidades diferentes, habitualmente entendido como, em água doce e no mar.

O ciclo de vida engloba duas fases tróficas distintas, uma fase filtradora e uma fase parasitária (Bird e Potter, 1983).



**Figura 4** – Ciclo de vida da lampreia marinha. 1) Lampreias machos e fêmeas procuram áreas para construir ninhos com cascalhos e pedras pequenas; 2) Os ovos fertilizados são colocados entre o cascalho e eclodem em algumas semanas; 3) As larvas emergem dos ninhos e deslocam-se para jusante; 4) As larvas enterram-se no lodo. Após 3 a 5 anos transformam-se em parasitas adultos; 5) No mar, as lampreias adultas alimentam-se de peixes. Cada lampreia em fase parasitária irá passar 12 a 18 meses no mar; 6) em fins de Dezembro, princípios de Janeiro as lampreias marinha adultas sobem aos rios para desovar (Adaptado de [www.boston.com](http://www.boston.com)).

Durante a fase larvar (fase filtradora), os amocetes, isto é, as larvas da lampreia marinha acumulam lípidos em tecidos como o hepático, renal, subcutâneo e mioseptos (Lowe, 1973). A vida larvar prolonga-se por 3-5 anos, permanecendo os amocetes

enterrados em fundos de areia ou gravilha. Após este período de tempo, os amocetes sofrem metamorfose para juvenis pelágicos, período em que os juvenis de lampreias utilizam as reservas lipídicas acumuladas na fase larvar e migram em direcção ao mar onde iniciam a fase parasitária do seu ciclo de vida, alimentando-se de sangue e músculo de peixes durante 12 a 24 meses (Beamish, 1980, Doadrio 2001). Esta fase marinha é acompanhada pela acumulação de grande quantidade de lípidos, particularmente no tecido muscular, o principal depósito de reservas energéticas (Sheridan, 1988) durante a migração reprodutora (Bird, 1993).

Quando adulto, fase final do ciclo de vida, as lampreias marinhas voltam aos rios para se reproduzir (Paton, 2001, Yung-Hsi, 2002).

A lampreia marinha inicia a sua migração reprodutora nas principais bacias portuguesas no final de Dezembro e início de Janeiro, com um pico em Fevereiro/Março, prolongando-se até Maio/Junho (Dias, 2001). Os machos constroem os ninhos em zonas em que o substrato é constituído predominantemente por cascalho, pedras e areia. Posteriormente ocorre a postura realizada por cada casal monogâmico, acabando os progenitores por morrer uns dias depois devido ao esgotamento das reservas energéticas e à falência de múltiplos órgãos e tecidos. (Larsen, 1980; Paton, 2001).

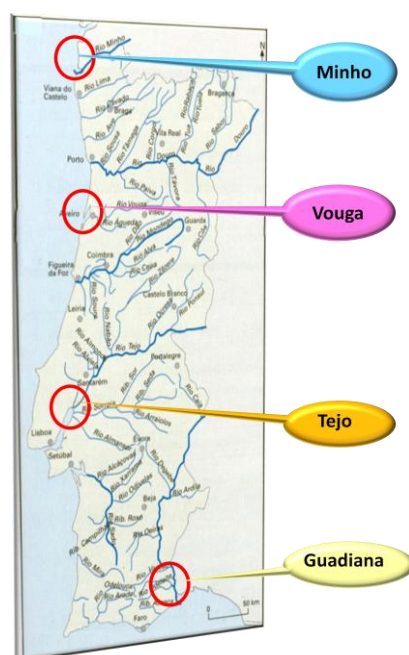
Na literatura encontra-se descrito que ocorrem alterações consideráveis na composição lipídica dos tecidos durante as várias fases do ciclo de vida (Pinela, 2009; Huynh, 2007).

Assim, a composição lipídica pode ser utilizada como biomarcador bioquímico proporcionando informações relacionadas às fases tróficas e complementando abordagens mais tradicionais como a determinação de actividades enzimáticas de enzimas chave do metabolismo lipídico. A composição em ácidos gordos tem um potencial importante, uma vez que possui uma assinatura característica nas fases tróficas, e como tal pode ser usada para obter informações muito interessantes sobre as condições ecológicas dos animais analisados (Bakes, 1995).

## **2.2. Locais de Captura em Portugal**

O rio Minho é um rio internacional partilhado por Portugal e Espanha. Nasce em Espanha, na Serra de Meira a uma altitude de 750 m e desagua em Portugal, no oceano Atlântico, em Caminha após um percurso de 300 km, dos quais 230 se situam em Espanha, servindo os restantes 70 km de fronteira entre os dois países (Loureiro e Machado, 1986) (Figura 5). A parte portuguesa da bacia hidrográfica do rio Minho encontra-se no extremo noroeste de Portugal, entre as coordenadas 41°45' e 43°40' N e 6°10' e 8°55' EW. A bacia

total cobre uma área de 17080 km<sup>2</sup>, Da totalidade da área da bacia, 16250 km<sup>2</sup> (95%) situam-se em Espanha e 799 km<sup>2</sup> (5%) em Portugal. A bacia hidrográfica do Rio Minho tem como limites: a sul a bacia do rio Lima e as ribeiras da costa atlântica, a sudeste a bacia do rio Douro e a norte as bacias hidrográficas da costa norte de Espanha (Loureiro e Machado, 1986; ARH do norte, 2010). Os principais afluentes são, em território espanhol e na margem direita, os Tamoga, Ladra, Avia, Tea e Louro, e, na margem esquerda, os Neia, Sil e Arnoya e, em Portugal, de montante para jusante, Trancoso, Mouro, Gadanha e Coura (ARH do norte, 2010).



**Figura 5** - Mapa dos rios de Portugal onde estão representados os locais de captura dos animais utilizados.

O rio Vouga nasce na serra da Lapa, a cerca de 930 m de altitude e percorre 148 km até desaguar na Barra de Aveiro. A sua bacia hidrográfica, com 3571 km<sup>2</sup> de área, sendo as suas coordenadas geográficas 40° 15' e 40°57' N 7° 33' e 8° 48' O. É confinada a Sul pela Serra do Buçaco, que separa assim as bacias do Rio Vouga e do Rio Mondego, e a norte pelas serras de Leomil, Montemuro, Lapa e Serra de Freita, que separam a bacia do Rio Vouga da bacia do rio Douro (ARH do centro, 2010) (Figura 5). Esta bacia não constitui, no seu conjunto, uma bacia “normal”, com um rio principal bem diferenciado e respectivos afluentes. Com efeito, trata-se de um conjunto hidrográfico de rios que actualmente desaguam muito perto da foz do Vouga, numa laguna que comunica com o mar, a Ria de Aveiro, havendo ainda uma densa rede de canais mareais e de delta relacionados com a mesma laguna. Os rios principais deste conjunto são o próprio Vouga (e seus afluentes até à confluência com o rio Águeda), o Águeda e o seu afluente, Cértima, podendo acrescentar-

se-lhe o Caster e o Antuã, na parte Norte, e o Boco e a ribeira da Corujeira, a Sul, todos desaguando na Ria de Aveiro mas hidrograficamente independentes do Vouga (ARH do centro, 2010).

O rio Tejo é o maior rio da Península Ibérica, estendendo-se ao longo de 1009 km, nasce em Muela de San Juan, na Serra espanhola de Albarracin, a 1953 m de altitude sendo as suas coordenadas geográficas 38° e 41° de latitude Norte e 01° e 10° de longitude Oeste (Loureiro & Macedo, 1986). Desagua no oceano Atlântico, por um largo estuário com cerca de 260 km<sup>2</sup>, a 15 Km a Oeste de Lisboa, em S. Julião da Barra (Figura 5). Depois de atravessar o planalto de Castela-a-Nova e a Extremadura espanhola, entre desfiladeiros e vales apertados, entra em Portugal. Antes disso, faz fronteira entre Espanha e Portugal através do troço internacional do Tejo, com uma extensão de cerca de 50 km (ARH do centro, 2010). A bacia hidrográfica do Rio Tejo cobre um total de mais de 80 500 km<sup>2</sup>, dos quais 24 650 km<sup>2</sup> são em Portugal, o que representa mais de 28% da superfície do Continente Português. Por ela são totalmente abrangidos os Distritos de Santarém e Castelo Branco e uma parte significativa dos Distritos de Lisboa, Leiria, Portalegre, Guarda, Évora e Setúbal. Em território português o Tejo recebe da margem esquerda o Sever, o Sorraia e o Almansor que, à excepção do primeiro, são rios de planície com as mesmas características do Tejo na sua secção inferior (ARH do centro, 2010). Da margem direita o Tejo recebe os rios Erges, Ponsul, Ocreza, Zêzere, Alviela e Maior, que descem da montanha, quase todos de carácter torrencial, sendo o mais importante o Zêzere, que tem a sua origem na serra da Estrela. Em Portugal o Rio Tejo, e a sua bacia hidrográfica, apresentam vários empreendimentos hidroeléctricos como o de Belver, Bouçã, Cabril, Castelo de Bode, Fratel, Maranhão e Montargil (ARH do centro, 2010).

Um dos três grandes rios luso-espanhóis, o rio Guadiana drena uma área total de cerca de 72 100 km<sup>2</sup>, sendo 11 500 km<sup>2</sup> em Portugal (Loureiro, 1986; ARH do Alentejo, 2010). O rio Guadiana nasce em Campo Montiel em Espanha, a 1700 m de altitude, desenvolvendo-se ao longo de 810 km até à foz, no oceano Atlântico, junto a Vila Real de Santo António. Localiza-se entre 37° e 40° de latitude Norte e 02° e 08° de longitude Oeste (Loureiro, 1986; ARH do Alentejo, 2010) (Figura 5). A bacia hidrográfica do rio Guadiana abrange uma superfície total de 66 800 km<sup>2</sup>, dos quais 55220 (83%) em Espanha e 11580 (17%) em Portugal. É a quarta maior bacia hidrográfica da Península Ibérica, depois das bacias do Douro, Ebro e Tejo. (Dias, 2001; ARH do Alentejo, 2010). A bacia nacional do Guadiana encontra-se delimitada a Norte pela bacia do rio Tejo, a Sul pelo Oceano Atlântico, a Este pela fronteira e a Oeste pelas bacias dos rios Tejo, Sado, Mira e Arade, estendendo-se pelas unidades morfoestruturais correspondentes ao Maciço Antigo e à Orla Meridional Algarvia. (Dias, 2001; ARH do Alentejo, 2010). Serve de fronteira entre os dois países até ao ponto em que penetra em território português, a norte de Mourão, e toma a

direcção norte-sul. O vale por ele formado encaixa-se na superfície polimórfica alentejana a partir da foz do Ardila, com muitos meandros e, entre Serpa e Mértola, apresenta rápidos e quedas de água sendo a mais importante a do Pulo do Lobo, que corresponde a um estreitamento súbito e desnivelado das suas margens. A partir de Mértola, o Guadiana torna-se navegável. Volta a servir de fronteira entre Pomarão e Vila Real de Santo António, onde desagua (Dias, 2001; ARH do Alentejo, 2010). O rio Guadiana possui um caudal muito variável, quer à escala sazonal, quer à escala inter-anual: em situação de tempestade o caudal pode exceder os 10 000 m<sup>3</sup>/s, mas, no Verão, são frequentes as situações de caudal praticamente nulo. O caudal médio corresponde aproximadamente a 80 m<sup>3</sup>/s (ARH do Alentejo, 2010). O estuário é alongado e estreito, de direcção geral E-W em Espanha e direcção N-S em Portugal, típico de um rio de vale encaixado; no entanto, na região correspondente à foz, surgem áreas de sapal - na margem portuguesa, trata-se do sapal de Castro Marim e, na margem espanhola, do sapal de Ayamonte. Ambas as regiões de sapal são zonas protegidas, com estatuto de Reserva Natural, constituindo importantes locais de invernada para numerosas espécies limícolas e locais privilegiados para a reprodução de peixes, moluscos e crustáceos (ARH do Alentejo, 2010).

### **2.3. Lípidos em peixes – influências ambientais**

Todas as classes de lípidos contêm ácidos gordos. Os ácidos gordos são designados com base no comprimento da cadeia, no grau de insaturação, ou número de ligações duplas, e pela posição destas na estrutura carbonada, podendo ser saturados, monoinsaturados e polinsaturados (Sargent, 2002; Gurr, 2002; Berg, 5ed).

Os ácidos gordos saturados ocorrem naturalmente nos animais, incluindo peixes, com comprimentos de cadeia que variam de C14 a C24. Os Fosfoglicéridos raramente contêm quantidades significativas de ácidos gordos saturados com excepção do C16:0, C18:0 e, em menor quantidade, do C20:0, restrição que reflecte a geometria invariável das bicamadas ricas em fosfoglicéridos que constituem as membranas celulares dos seres vivos, especialmente a membrana plasmática, o retículo endoplasmático e seus derivados (Sargent, 2002; Gurr, 2002).

Os ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) mais uma vez ocorrem naturalmente, com comprimentos de cadeia de C14 a C24, com os fosfoglicéridos possuindo raramente comprimentos de cadeia diferente de C16, C18 e, em menor quantidade, C20. No entanto, os esfingolípidos são geralmente ricos em ácido nervónico, C24:1 $\omega$ 9. Os ácidos gordos abundantes nos triacilgliceróis de muitos peixes são o C20:1 $\omega$ 9, ou ácido gadoleico e o C22:1 $\omega$ 11, ou ácido cetoleico (Sargent, 2002; Gurr, 2002).



Os organismos marinhos, principalmente algas, podem conter uma grande quantidade de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) com comprimento da cadeia C16 com 2 a 4 ligações duplas, C18 com 2 a 5 ligações duplas, C20 com 2 a 5 ligações duplas e C22 com 2 a 6 ligações duplas) (Sargent, 1995). Em peixes, os principais PUFA a serem considerados são o C20:4 $\omega$ 6, ou o ácido araquidónico e o seu precursor metabólico C18:2 $\omega$ 6, ou ácido linoleico, bem como, o C20:5 $\omega$ 3, ou ácido eicosapentaenóico e o C22:6 $\omega$ 3, ou ácido docosahexaenóico e o seu precursor metabólico C18:3 $\omega$ 3, ou ácido linolénico. Outro termo de uso comum em aquicultura é HUFA, a abreviatura de ácidos gordos altamente insaturados (Sargent, 2002).

Os ácidos gordos são utilizados como reserva energética a longo prazo para serem mobilizados em períodos de exercício intenso ou durante jejum ou alimentação inadequada (Berg, 2002). Os ácidos gordos podem existir como componentes de cadeia linear muito insaturados no caso dos lípidos dos peixes (Gurr, 2002; Berg, 2002). Como os peixes possuem uma capacidade única para metabolizar estes compostos consequentemente, podem sobreviver por longos períodos de tempo sob condições de privação de alimentos (Cowey e Sargent, 1972; Cowey e Sargent, 1977; Halver, 1980). Um exemplo típico é o salmão que consome durante semanas, lípidos de reserva, na viagem extenuante de retorno aos rios, para desovar, garantindo desse modo todos os processos biológicos vitais (Halver, 1980).

Muitos estudos sobre nutrição de peixes têm sido publicados contendo diversas informações acerca dos seus requisitos lipídicos (Silva e Anderson, 1995; Webster e Lim, 2002). A truta arco-íris tem carência em ácidos gordos essenciais da família dos  $\omega$ 3 e não dos  $\omega$ 6, como acontece com a maioria dos mamíferos (Ackman, 1967; Ackman, 1999, (Silva e Anderson, 1995; Webster e Lim, 2002).

Diferenças na composição em ácidos gordos de peixes marinhos e de água doce tem sido descritas por vários autores (Halver, 1980). Estudos realizados por Castell (1979) revelaram que, apesar de os peixes serem ricos em  $\omega$ 3, os peixes de água doce possuem níveis mais elevados de ácidos gordos  $\omega$ 6 do que as espécies marinhas. As razões médias  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 são 2,7 para peixes de água doce e 6,3 para peixes marinhos. (Cowey e Sargent, 1977; Halver, 1980).

Os fosfolípidos são geralmente considerados como lípidos estruturais e/ou funcionais, sendo incorporados, em grande medida, na estrutura membranal das células e partículas subcelulares.

A razão  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 parece diminuir com o decréscimo da temperatura, segundo Castell (1979), pelo que a necessidade de  $\omega$ 3 parece ser maior nos peixes criados a baixas temperaturas (Ackman, 1967; Castell, 1979; Ackman, 1999). A razão  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 determinada

nos lípidos dos peixes parece ser muito afectada pela razão  $\omega 6/\omega 3$  de lípidos da dieta (Castell, 1979). Quando a razão da dieta é muito rica em ácidos gordos  $\omega 6$  fornecidas pela gordura animal ou óleos vegetais, existe uma tendência para que os peixes alterem a razão de PUFA incorporados a favor dos ácidos gordos  $\omega 3$  (Ackman, 1967; Castell, 1979; Ackman, 1999).

Existe inibição competitiva do alongamento e insaturação entre as famílias de ácidos gordos sendo geralmente seguida a ordem  $\omega 3 > \omega 6 > \omega 9$  (Meed, e Kayama, 1967).

Os peixes não são capazes de sintetizar qualquer dos ácidos gordos das famílias  $\omega 6$  e  $\omega 3$  sem que um precursor dessa estrutura  $\omega$  esteja presente na dieta (Castell, 1979; Halver, 1980). A capacidade de alongamento e insaturação dos ácidos gordos não é a mesma para todas as espécies de peixes (Meed, e Kayama, 1967; Halver, 1980).

Os EFA e ácidos gordos saturados e monoinsaturados são utilizados pelos peixes para a produção de energia (Meed, e Kayama, 1967). É possível que os EFA possuam um papel relevante na permeabilidade, bem como, na plasticidade das membranas. O papel dos ácidos gordos  $\omega 3$  na permeabilidade das membranas pode ser um dos factores responsáveis pelas diferenças no conteúdo dessa família de ácidos gordos entre peixes de água doce e marinhos (Silva e Anderson, 1995; Webster e Lim, 2002).

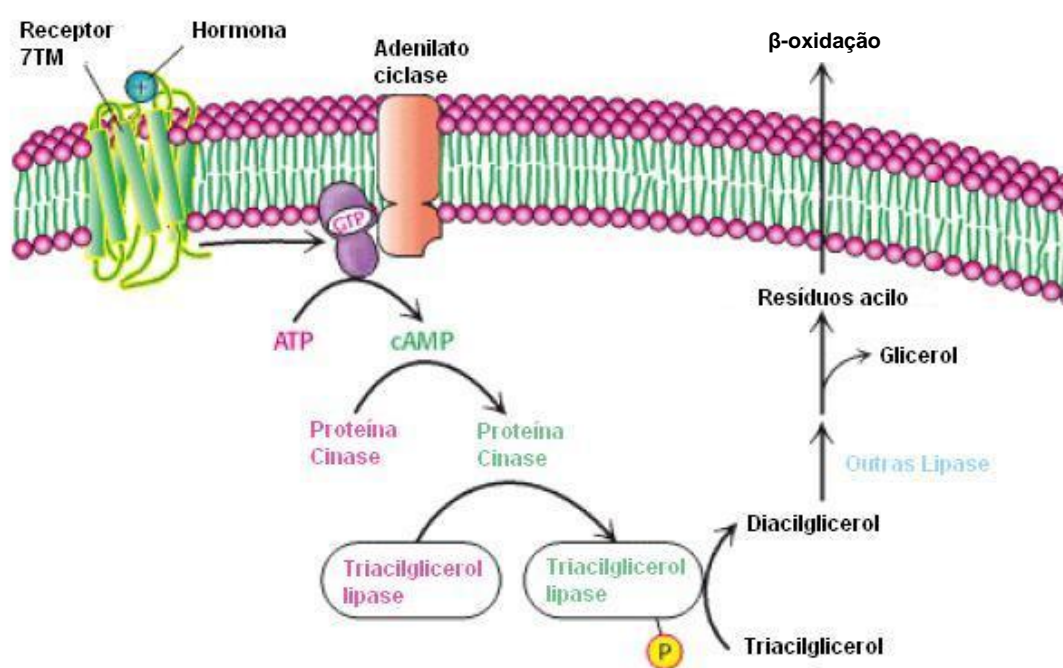
Mitocôndrios de peixes onde se observam níveis elevados de PUFA  $\omega 3$  e muito baixos de ácidos gordos  $\omega 6$  são semelhantes aos dos mitocôndrios de mamíferos em termos de conteúdo em citocromos,  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos, ciclo dos ácidos tricarboxílicos, cadeia respiratória e fosforilação oxidativa. Os PUFA  $\omega 3$  podem desempenhar o mesmo papel em peixes que os ácidos gordos  $\omega 6$  desempenham em ratos. Os EFA desempenham, ainda, um outro papel no mitocôndrio, além da sua importância na estrutura das membranas, pois são importantes na modelação de alguns sistemas enzimáticos (Meed, e Kayama, 1967; Halver, 1980).

## **2.4. Enzimas envolvidos na regulação do metabolismo lipídico**

Os enzimas designados por lipases desempenham um papel essencial na digestão, transporte e processamento de lípidos da dieta, encontrando-se ubiquamente distribuídos pelos animais, plantas e procariotas (Svendsen, 2000).

Em particular, os enzimas TGL são serina hidrolases responsáveis pela hidrólise de resíduos acilo esterificados com o triálcool glicerol, presentes em lípidos de reserva como os triacilgliceróis, vulgarmente designados por lípidos neutros (Figura 6). Este enzima controla o passo regulador da lipólise, sendo por esse motivo marcador da disponibilização de lípidos de reserva. Em termos metabólicos sofre regulação a curto prazo pelo par

glucagina/adrenalina, insulina, onde o primeiro comporta-se como efector hormonal positivo e os segundos, como efectores hormonais negativos (LaRosa, 1972; Berg, 2002). Os enzimas TGL exercem a sua acção após activação por uma via de sinalização celular regulada pela hormona glucagina que ao contactar receptores 7TM citoplasmáticos, desencadeia um conjunto de respostas que envolve a libertação do 2º mensageiro, cAMP pela Adenilato ciclase na presença de GTP. (LaRosa, 1972; Berg, 2002) O cAMP activa então uma proteína cinase que após transferência de grupo fosfato o TGL, o converte na sua forma activa desencadeando a reacção hidrolítica. (LaRosa, 1972; Berg, 2002). Os resíduos acilo libertados podem assim ser utilizados pela  $\beta$ -oxidação mitocondrial. (LaRosa, 1972; Berg, 2002).

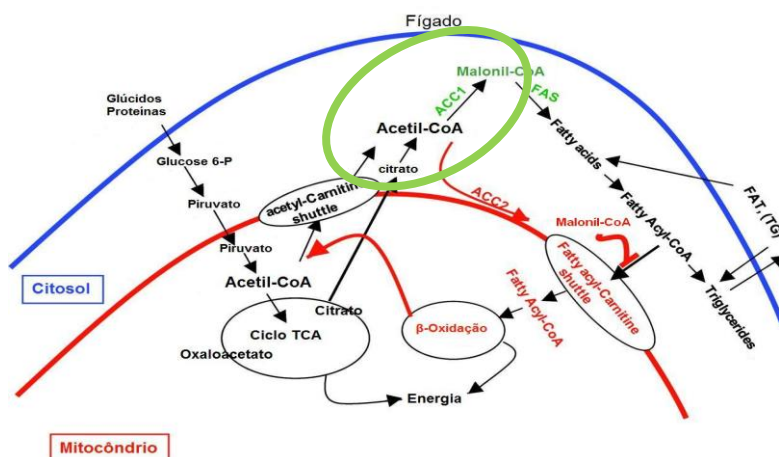


**Figura 6** – Metabolismo dos triacilgliceróis. Activação de TGL por via de sinalização celular (adaptado de Berg, 2002).

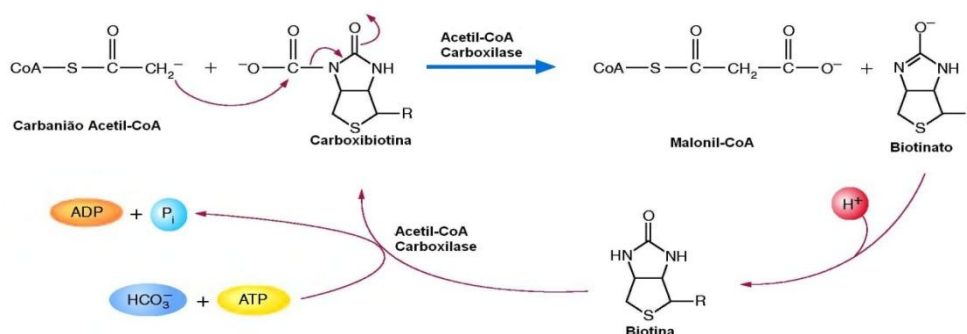
Por outro lado, o enzima ACC catalisa o passo regulador da biossíntese endógena de ácidos gordos, sendo por esse motivo um marcador da sua reposição na célula por uma via distinta da dieta. Em termos reaccionais, o enzima AAC catalisa a carboxilação irreversível do acetil-CoA em malonil-CoA, conservando as actividades biotina carboxilase e carboxiltransferase, utilizando a biotina como doador de  $\text{CO}_2$  (Tong, 2005).

As Figuras 7 e 8 ilustram o processo de formação do malonil-CoA.



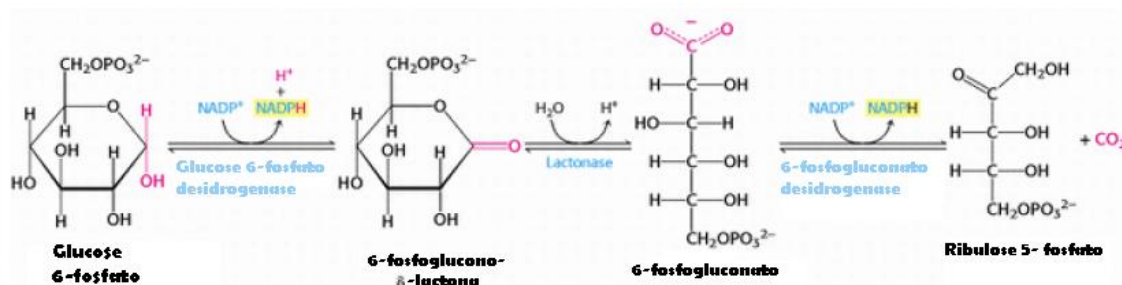


**Figura 7 – Metabolismo de lípidos (adaptado de Baram, 2005).**



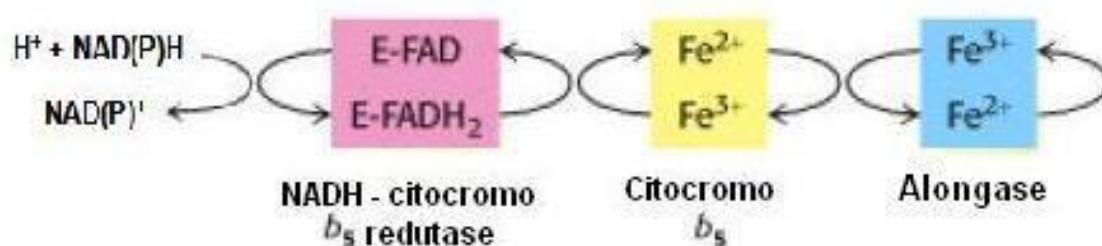
**Figura 8 – Formação de malonil-CoA (adaptado de Berg, 2002).**

O malonil-CoA é posteriormente utilizado pelo complexo ácido gordo sintetase no alongamento de uma cadeia carbonada que leva à formação de ácidos gordos (Berg, 2002). Outra enzima indispensável à lipogénese é o G6PD, citoplasmático que catalisa o passo regulador da via das pentoses fosfato (Figura 9) e gerador de equivalentes redutores sob a forma de NADPH, indispensáveis à construção da cadeia carbonada dos ácidos gordos e/ou isoprenóides, no tecido hepático, adiposo e cápsulas supra-renais (Corpas, 1998; Cappellini, 2008).

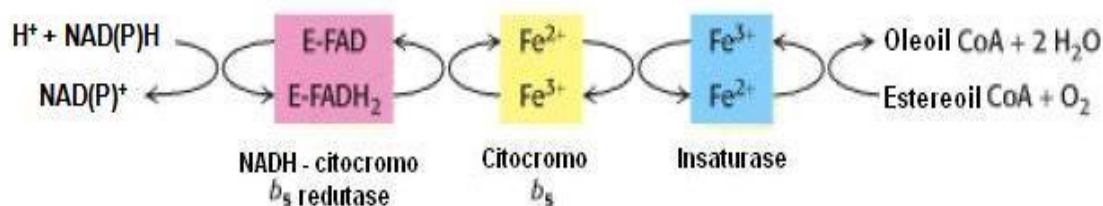


**Figura 9** - Fase oxidativa da via das pentoses fosfato. Glicose-6-fosfato é oxidada a 6-fosfoglucono-δ-lactona a gerar uma molécula de NADPH. O produto lactona é hidrolisado a 6 - fosfogluconato, que é descarboxilado oxidativamente a ribulose 5-fosfato com a geração de uma segunda molécula de NADPH (adaptado de Berg, 2002).

Outros enzimas importantes do metabolismo lipídico são hemoproteínas alongases e insaturases localizados no retículo endoplasmático que também sofrem activação por via de sinalização celular que envolve a cadeia de transporte de electrões RE que aceita como doadores de equivalentes redutores NADH ou NADPH que doam electrões ao enzima NADH-citocromo  $b_5$  redutase que em seguida os transfere para o citocromo  $b_5$  que então activa os enzimas alongases e insaturases modificadores de resíduos acilo, como descrito nas Figuras 10 e 11 (Berg, 2002).



**Figura 10** – Via de activação de alongases do RE (Berg, 2002).

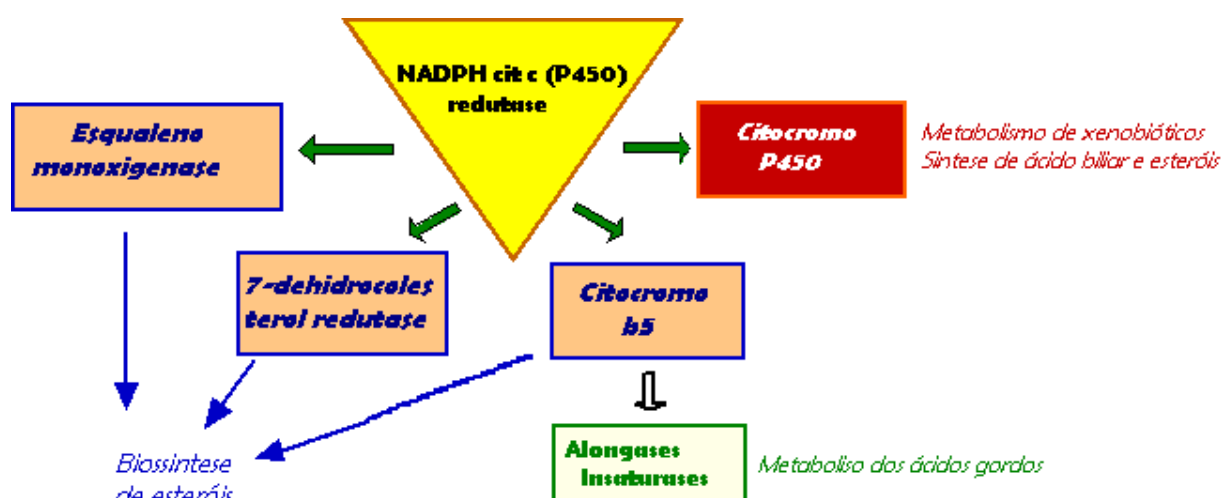


**Figura 11** – Via de activação de insaturases do RE (Berg, 2002).

Se o enzima localizado no final da cadeia de transporte de electrões for uma alongase (Figura 10) ocorre um aumento do tamanho da cadeia carbonada em duas unidades de C doados pelo malonil-CoA à custa de equivalentes redutores (NAD(P)H). Se o enzima for uma insaturase (Figura 11) ocorre aumento do nível insaturação da cadeia carbonada através  $O_2$  activados por electrões doados pelo NAD(P)H (Arukwe, 1997; Berg, 2002).

O enzima NADPH P450 redutase (CPR), outro enzima do retículo endoplasmático, está também envolvido na transferência de equivalentes redutores ao nível deste sistema membranar, mas neste caso activa citocromos P450 envolvidos na biotransformação de xenobióticos, biossíntese de hormonas esteróides e lípidos envolvidos em vias de sinalização celular. O enzima CPR pode doar electrões ao 7-dihidrocolesterol reductase envolvido na biossíntese de esteróis, bem como, para o citocromo  $b_5$ , que suporta tanto a síntese de esteróis como as vias de insaturação e alongamento dos ácidos gordos (Figura 12). Do ponto de vista estrutural o enzima CPR é uma flavoproteína portadora de FAD e

FMN. Dispõe de uma estrutura modular sugestiva da sua evolução a partir de subunidades menores e semelhantes às flavodoxinas e ferredoxina NADP<sup>+</sup> redutase. Coerente com as suas múltiplas funções na célula, o CPR é uma proteína amplamente expressa, podendo estar presente em vários tecidos mas existindo em mais abundância no fígado, sendo a sua expressão regulada pelo eixo hipófise-tiróide onde a hormona T3 da tiróide desempenha papel relevante. A escolha deste enzima neste estudo, justifica-se como bom marcador funcional da fracção microssomal, bem como, indicador primário da indução de vias de biotransformação, como resposta a poluentes do meio e hormonas esteróis (Williams, 1962; Li, 2001).



**Figura 12** – Parceiros redox do enzima NADPH cit c (P450) redutase (adaptado de [www.uky.edu/Pharmacy](http://www.uky.edu/Pharmacy)).

O hemo é um grupo prostético que consiste num átomo de ferro ligado por quatro ligações de coordenação a quatro grupos pirrolo do anel protoporfírico IX. A quantificação do hemo na fracção microssomal consiste numa quantificação aproximada da concentração de citocromo b5 e citocromos P450, podendo por vezes ser considerado um indicador grosseiro de expressão enzimática no retículo endoplasmático (Hardison, 1999).



### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Estratégia

A concretização dos objectivos traçados para este trabalho obedeceu ao plano:

**Local de Realização:** Laboratório do Enologia /ICAAM/pólo da Mitra (ECT),  
Laboratório de Bioquímica Analítica, Fase III, do Departamento de  
Química sito no Colégio Luís António Verney, Escola de Ciências e  
Tecnologia, Universidade de Évora;

**Apoios:** Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM) e  
Departamento de Química, Universidade de Évora.

**Duração:** Um ano lectivo.

**Modelo biológico:** Lampreia marinha (*Petromyzon marinus* L.).

**Agrupamento dos animais:** Grupos de dez animais por cada bacia em estudo.

**Órgão seleccionado:** Fígado.

**Fracções sub-celulares seleccionadas:** pós-16000 g  
microsomal

**Parâmetros:**

- Conteúdo em proteínas das fracções 16000 g e microsomal
- Marcadores não-enzimáticos
  - Hemo microsomal
- Marcadores enzimáticos:
  - Triacilglicerol Lipase (TGL)
  - Acetil-CoA Carboxilase (ACC)
  - Glucose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD)
  - Alongases e Insaturases microssomais
  - NADPH (P450) redutase (CPR)
- Perfil hepático de lípidos neutros (NL) e polares (PL).

**Técnicas utilizadas:**

Desintegração celular, homogeneizador tipo Potter

Fraccionamento celular, centrifugação e ultracentrifugação preparativas

Conteúdos - proteínas, espectrometria de absorção molecular

- Hemo total, espectrometria de absorção molecular

Actividades enzimáticas - TGL, titulimetria;

- AAC, G6PD e CPR, espectrometria de absorção molecular;

- Alongases e Insaturases, cromatografia gasosa (GC)

Perfil lipídico hepático - Extracção lípidos por solventes a pressão elevada Folch/ ASE;

- determinação de NL e PL por GC.

**Análise estatística dos resultados:**

O pacote estatístico SPSS para Windows (versão 18) e Primer (versão 6.0) foram utilizados para o tratamento e análise estatística. As transformações dos dados foram utilizadas de forma a garantir os pressupostos de normalidade, independência e homocedasticidade. Os valores resultantes dos cromatogramas para cada um dos ácidos gordos encontram-se expressos em percentagem do total de todos os ácidos gordos identificados de modo a eliminar efeitos de concentração.

A MANOVA foi utilizada para verificar os principais efeitos e interacção de efeitos das variáveis género e bacia hidrográfica sobre as nossas variáveis dependentes, isto é, os ácidos gordos e para testar a nossa hipótese nula  $H_0$ : lampreias capturadas em bacias hidrográficas distintas apresentam perfil lipídico de ácidos gordos dos lípidos neutros e polares do fígado idênticos.

A análise de variância simples, ANOVA I e teste de significância de *Duncan* foi utilizada para os resultados incluindo conteúdos e actividades enzimáticas obtidos a partir de dez experiências independentes.

## **3.2. Procedimento Experimental**

### **3.2.1. Material biológico**

No início da época reprodutiva foram capturas 40 lampreias adultas em quatro bacias hidrográficas portuguesas: Minho, Vouga, Tejo (2008) e Guadiana (2009) no âmbito do projecto PTDC/BIA-BDE/71826/2006.

### **3.2.2. Captura e eutanásia**

Os animais foram capturados em quatro bacias hidrográficas localizadas no Norte, Centro e Sul do país (Figura 12) e foram transportados vivos para o laboratório num tanque em polietileno com cerca de 0.4 m<sup>3</sup> de capacidade, ao qual foi acoplada uma bomba oxigenadora. No laboratório foram colocados em tanques de fibra de vidro com 2 m<sup>3</sup> e 4 m<sup>3</sup> de capacidade, equipados com sistemas de suporte de vida apropriados. Na eutanásia das lampreias capturadas utilizou-se uma solução anestésica de 2-fenoxietanol em 1mL/L de água numa mala térmica, onde se colocou um indivíduo de cada vez minutos antes dos ensaios biométricos.

### **3.2.3. Determinação dos parâmetros biométricos e recolha de fígado**

Para todas as lampreias procedeu-se à determinação dos dados biométricos dos indivíduos: peso total (PT, g) e comprimento total (CT, cm) - entre a extremidade bucal e da barbatana caudal. Posteriormente, procedeu-se à dissecção e à recolha do fígado. Este foi lavado com uma solução gelada de NaCl (0.9%). Em seguida foi pesado e fraccionado em porções de 1,5 g as quais foram envolvidas em folha de alumínio e finalmente guardadas em sacos de plástico previamente etiquetados. As amostras foram seguidamente colocadas em *canisters*, mergulhadas em azoto líquido e posteriormente armazenadas em arcas frigoríficas a -80° C.

### **3.2.4. Determinação do perfil em ácidos gordos**

#### **3.2.4.1. Extracção de lípidos totais**

Durante a extracção de lípidos totais do fígado de lampreia, as amostras foram submetidas a vários processos preparativos. Após pesagem, peso fresco  $\pm 1$  g, foram liofilizadas e pesadas de novo para determinação do peso seco. Posteriormente as amostras foram maceradas, num almofariz de porcelana, e misturadas com 10 g de agente

inerte, terra de diatomáceas. A mistura formada foi então colocada em células de extracção de 34 mL, nas quais tinham sido previamente colocados 2 filtros celulósicos, e preenchidas com terra de diatomáceas e seladas. A célula foi colocada no aparelho ASE 100 e procedeu-se à extracção pelo método Folch (1957) de acordo com o Programa 24 indicado no Quadro 1:

**Quadro 1** - Condições da extracção dos lípidos.

Parâmetros	Condições
Temperatura	100 °C
Pressão	13,8 MPa
Mistura Solvente	Clorofórmio:metanol (60%:40%) com BHT (100 mg/L)
Nº de Ciclos de extracção estáticos	2
Tempo de ciclo	5min
Purga das células	Azoto durante 60s

### 3.2.4.2. Separação de lípidos neutros e lípidos polares de uma extracção de lípidos totais

Para se proceder à separação de lípidos neutros (LN) e lípidos polares (LP) a partir do extracto de lípidos totais (LT), recolheu-se o extracto LT para um balão de vidro levando-o à secura em evaporador rotativo. Após secagem pesou-se o resíduo obtido (Peso 1: LT). Posteriormente ressuspendeu-se o extracto em 3 mL de clorofórmio e passou-se 1mL para tubos de derivatização previamente etiquetados e tarados guardando-se os restantes 2 mL a 0-5° C. O resíduo do tubo de derivação foi então seco em corrente de azoto para separação em classes de lípidos (Peso2: LP+LN). Após ser levado à secura adicionou-se 3 mL de acetona gelada e conservou-se o extracto em gelo. Levou-se a centrifugar, 1000 g , 30min de modo a sedimentar os LP. O sobrenadante, que corresponde aos lípidos neutros (LN), foi recolhido, a acetona foi evaporada em corrente de azoto e registou-se o seu peso (Peso3: LN). O precipitado, correspondente aos LP, foi pesado (Peso 4), armazenado a 0-5°C até subsequente utilização.



### 3.2.4.3. Saponificação e metilação

Para proceder à saponificação e metilação foi adicionado aos tubos contendo quer o extracto de LP quer os extractos LN, 1mL de solução metanólica de NaOH 0,5M (2g de NaOH/100 mL de metanol). Os tubos foram rolhados mas sem apertar e procedeu-se à saponificação, durante 15 min a 70 °C em banho-maria, na hotte. Deixou-se arrefecer ligeiramente os tubos e adicionou-se 1mL de BF<sub>3</sub> em metanol a 10%, aguardando 10 min a 70°C, em banho-maria pela metilação. Após arrefecimento procedeu-se à adição de 6 mL de água destilada e, depois, à adição de 2 mL de éter do petróleo agitando-se vigorosamente. Recolheu-se o sobrenadante para um novo frasco etiquetado e adicionou-se 50 µL de padrão interno (C19:0). Em seguida, as amostras foram concentradas sob corrente de azoto.

### 3.2.4.4. Análise cromatográfica

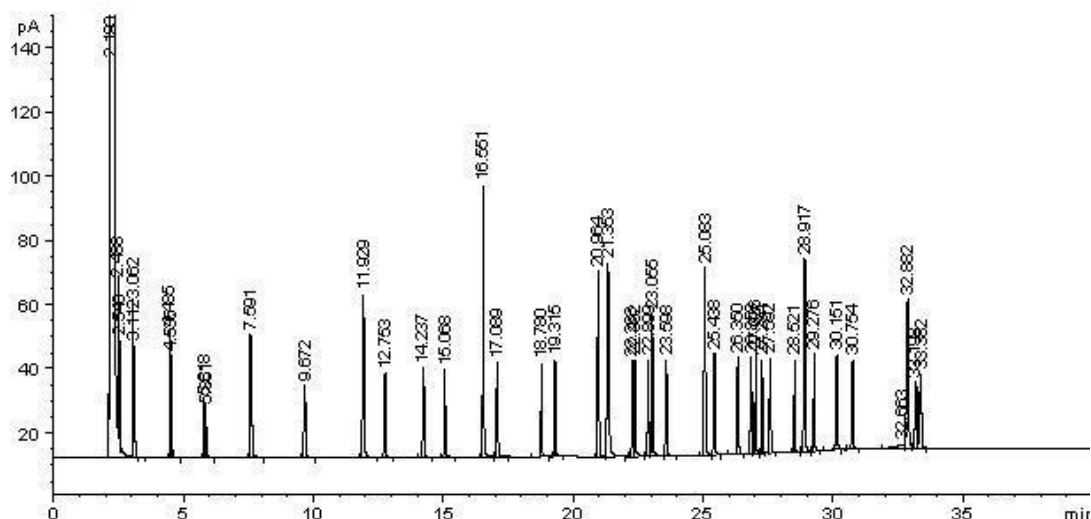
Os ésteres metílicos dos ácidos gordos das amostras de fígado foram analisados por cromatografia gás-líquido num sistema Hewlett Packard HP 6890 Series GC com software HPChem (2002) e equipado com um injector *split-splitless*, um amostrador automático e um detector de ionização por chama (FID). A coluna utilizada foi uma coluna capilar de sílica fundida Omegawax 320 (30 m de comprimento × 0,32 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura de filme) da Supelco (Bellafonte, PA). A fase móvel utilizada foi hélio com um fluxo de 1,2 mL/min.

As condições experimentais usadas foram as seguintes:

- ✓ Temperatura do injector: 250°C
- ✓ Temperatura do detector: 270°C
- ✓ Temperatura inicial do forno: 140-240°C
- ✓ Taxa de rampa: 4°C/min

### 3.2.4.5. Identificação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos

Os ésteres metílicos dos ácidos gordos foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção com padrões conhecidos (FAME mix 37 componentes, Supelco 47885-U, mais o éster metílico de ácido gordo C22:5ω3) (Figura 13) por cromatografia em condições idênticas às da cromatografia gasosa das amostras.



**Figura 13** – Traçado de um cromatograma padrão, pelo software *HPChem* (2002).

### 3.2.5. Fraccionamento celular dos tecidos

#### 3.2.5.1. Homogeneização e preparação da fracção microssomal

A fracção microssomal foi preparada de acordo com o procedimento geral de Lake (1987). A amostra de fígado de lampreia foi descongelada e mergulhada em tampão de homogeneização (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 0,154 M). O órgão foi pesado ( $\pm 1$ g) e transferido para o copo de homogeneização mantido em gelo ao qual adicionou-se 3 mL de tampão de homogeneização. O homogeneizado foi coado por um passador de rede para um tubo de centrífuga mantido previamente a 4°C.

Seguidamente procedeu-se à centrifugação do homogeneizado a 800 g durante 20 min a 4°C (Lake, 1987; Sugimoto, 1990). Recolheu-se o sobrenadante para um novo tubo de centrífuga que voltou a ser centrifugado, desta vez a 15000 g durante 30 min (Lake, 1987; Sugimoto, 1990; Bartholomaeus, 1994; Biro-Sauveur, 1994; Chhabra e Rao, 1994; Kim, 1998). Transferiu-se o sobrenadante resultante para tubos de ultra-centrifuga (4°C) e foi a centrifugar a 105000 g durante 1h a 4°C.

O sobrenadante foi recolhido e o sedimento foi ressuspensionado em 3 mL de tampão de homogeneização. Ambos foram armazenados a -20°C até posterior utilização (Lake, 1987; Sugimoto, 1990; Kore, 1993; Biro-Sauveur, 1994; Chhabra e Rao, 1994). Utilizámos parte da fracção microssomal assim obtida para determinar de imediato a concentração de proteínas e do hemo, guardámos a porção remanescente a -20°C para determinação da actividade enzimática NADPH (P450) redutase de acordo com Lake (1987).

### **3.2.5.2. Preparação do sobrenadante pós-16000 g**

O sobrenadante pós-16000 g foi preparado de acordo com o procedimento de Kao (1997). A amostra de fígado de lampreia foi pesada ( $\pm 1$  g) foi homogeneizada em 5 volumes de tampão de homogeneização (Hepes (25 mM); KF (100 mM); EDTA (5 mM); EGTA (5 mM); PMSF (0,1 mM), pH 7,5) a 4°C. Após a homogeneização a amostra foi centrifugada a 1000 g durante 10 min a 4°C. Recolheu-se a camada infranadante que voltou a ser centrifugada a 16000 g durante 30 min a 4°C. O sobrenadante resultante desta última centrifugação – preparação enzimática – foi guardado a -20°C até posterior utilização.

Utilizamos parte da fracção assim obtida para determinar a concentração de proteínas e as actividades enzimáticas acetil-CoA carboxilase, triacilglicerol lipase e glucose-6-fosfato desidrogenase.

### **3.2.6. Análise quantitativa das fracções sub-celulares**

#### **3.2.6.1. Determinação da concentração de proteína total**

Utilizou-se o método de Lowry (1951) cujo princípio reaccional se fundamenta na reacção, catalisada pelo cobre em meio alcalino, entre o reagente de Folin-Ciocalteu, ou ácido fosfomolibdicofosfotungstico, e os resíduos de aminoácidos aromáticos tirosina e triptofano das proteínas, levando á formação de um complexo heteromolibdénico de cor azul intensa. Embora a resposta do método dependa da composição em aminoácidos da proteína, o seu maior problema tem a ver com o elevado número de substâncias que podem interferir na reacção. Os interferentes podem ser aminoácidos e seus derivados, constituintes de soluções tampão detergentes, drogas, glúcidos, ácidos nucleicos, sais e reagentes sulfidrílicos. Contudo, escolheu-se este método devido á sua elevada sensibilidade e ao facto de as substâncias interferentes encontrarem-se muito diluídas e, como tal, os seus efeitos estarem minimizados.

Preparou-se uma curva de calibração para o intervalo de 50-200  $\mu\text{g/mL}$ , a partir de uma solução-mãe de albumina de soro bovino, BSA (500  $\mu\text{g/mL}$ ).

Tomou-se uma alíquota de 0,025 mL da fracção microssomal e do sobrenadante pós-16000 g que foram diluídas com NaOH 0,5 M para um volume final de 0,250 mL.

Adicionou-se a 0,250 mL de cada solução-padrão ou das amostras diluídas, 1,250 mL de reagente de Lowry, constituído por sulfato de cobre penta-hidratado 0,1% (p/v), tartarato de sódio e potássio 0,2% (p/v) em carbonato de sódio a 2% (p/v). Após agitação no vórtex adicionou-se 0,125 mL de reagente de Folin diluído  $\frac{1}{2}$  com água bidestilada e voltou-se a agitar. Aguardámos 30 min. Após nova agitação no vórtex leu-se à absorvência a 720

nm. Construiu-se a curva de calibração com os valores obtidos (Figura A1) e calculou-se, por interpolação gráfica a concentração de proteínas das amostras.

### **3.2.6.2. Determinação da concentração do Hemo**

A concentração do hemo da fracção microssomal do tecido em estudo foi determinada, de acordo com a metodologia de Omura e Sato (1964) e Luke (1987), a partir do espectro de absorção molecular da sua forma reduzida traçado contra um branco que continha a forma oxidada obtida por reacção do hemo com a piridina em meio alcalino.

Tomou-se 0,375 mL de fracção microssomal do tecido em estudo e diluiu-se para metade com KCl 0,154 M. Distribuiu-se igual volume da solução obtida por duas células do espectrómetro de absorção molecular e adicionou-se 0,250 mL e 0,245 mL de NaOH (0,5M) às células de leitura e de referência, respectivamente.

Adicionou-se, ainda, a cada célula 0,250 mL de piridina tendo em seguida, sido adicionada uma pequena quantidade de ditionito de sódio à célula de leitura e 0,005 mL de solução de ferrocianeto de potássio ( $K_3Fe(CN)_6$ ) 12,5 mM à célula de referência.

Após agitação suave, traçou-se um espectro de absorção entre 600 e 530 nm e registou-se a diferença de absorvência obtida entre 557 e 575 nm, a qual foi utilizada para o cálculo da concentração do hemo por mg de proteína, considerando o valor do coeficiente de absorvidade molar deste, na sua forma reduzida de  $34,7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Lake, 1987).

### **3.2.7. Determinação das actividades enzimáticas**

#### **3.2.7.1. Acetil-CoA Carboxilase**

A actividade enzimática Acetil-CoA carboxilase foi determinada de acordo com o procedimento de Kao (1997) e utilizando sobrenadante pós-16000 g. Em cada tubo de ensaio foi adicionado 0,3 mL de mistura de pré-incubação, constituída por ditionitrol (1 mM);  $MgCl_2$  (20 mM); citrato de sódio (20 mM); BSA (0,5 mg/mL), dissolvidos em tampão Tris-HCl (50 mM) pH 7,5 aos quais adicionou-se aliquota de fracção pós-16000 g com concentração aproximada de proteínas de 15 mg/mL, e 0,030 mL de tampão de homogeneização constituído por KF (100 mM); EDTA (5 mM); EGTA (5 mM); PMSF (0,1 mM) dissolvidos em tampão Hepes (25 mM) pH 7,5. Os tubos encubaram a 25 °C com agitação orbital durante 1 h. Após a pré-incubação iniciou-se a reacção com a adição de mistura de activação constituída por ATP (5 mM); Acetil-CoA (0,2 mM);  $NaHCO_3$  (5 mM), procedendo-se à sua incubação durante 30 min também a 25 °C. Colectaram-se alíquotas da mistura de ensaio em intervalos de 10 min para quantificação de fosfato libertado pelo método de Ames por

leitura da absorvência a 820 nm (Ames, 1966). Construiu-se uma curva de calibração de fosfato, entre 0 e 30  $\mu\text{M}$  e calculou-se, por interpolação gráfica o produto libertado (Figura A2). Determinámos, posteriormente o valor dos coeficientes angulares das rectas obtidas (Figura B1) e a partir destes calculámos a actividade enzimática específica por mg de proteína.

### **3.2.7.2. Triacilglicerol Lipase**

A actividade enzimática Triacilglicerol lipase foi determinada de acordo com o procedimento geral de Prabhu (1999) e utilizando sobrenadante pós-16000 g. Colocou-se em microtubos, 0,2 mL de goma acácia 7,5 % e adicionou-se 0,020 mL de trioleína e 0,850 mL de tampão de homogeneização (Hepes (25 mM); KF (100 mM); EDTA (5 mM); EGTA (5 mM); PMSF (0,1 mM) pH 7,5). Seguidamente precedeu-se à agitação dos microtubos durante 2 min no vórtex de forma a obter-se uma emulsão estável. Após agitação adicionaram-se alíquotas de sobrenadante pós-16000 g com uma concentração aproximada de proteína entre 15 mg/mL, sendo os microtubos colocados num banho a 30 °C com agitação orbital. Recolheram-se alíquotas em intervalos de 2 min durante 6 min, para copos de titulação contendo 1 mL de metanol e 0,020 mL de fenolftaleína. A mistura de reacção foi titulada com NaOH 0,001 M até se observar alteração estável da cor. Determinámos, posteriormente o valor dos coeficientes angulares das rectas obtidas pelo NaOH gasto na titulação (Figura C1) e a partir destes calculámos a actividade enzimática específica por mg de proteína.

### **3.2.7.3. Glucose-6-fosfato desidrogenase**

A actividade enzimática Glucose-6-fosfato desidrogenase no sobrenadante pós-16000 g foi determinada de acordo com o procedimento de Postma (1989). Incubaram-se em células de espectrómetro de absorção molecular, alíquotas de sobrenadante pós-16000 g, com concentração aproximada de proteínas de 15 mg/mL sendo o meio de incubação constituído por NADP<sup>+</sup> (dissódico) (0,04 M), MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,5 M) e água destilada diluídos em tampão Tris-HCl (1 M) pH 8. Iniciou-se a reacção com a adição de glucose-6-fosfato (0,1 M), após pré-incubação dos restantes constituintes da mistura de ensaio durante 2 min a 37°C.

Registou-se, então, a variação de absorvência devido á formação de NADPH, ao longo do tempo durante 180 s, a 340 nm, lida contra um branco de composição idêntica à das células de leitura, mas onde a amostra foi substituída por igual volume de solução tampão Tris-HCl (1 M) pH 8. Determinou-se, posteriormente o valor dos coeficientes

angulares das rectas obtidas (Figura D1), a partir dos quais calculou-se a actividade enzimática específica por mg de proteína.

#### **3.2.7.4. NADPH citocromo c (P450) redutase**

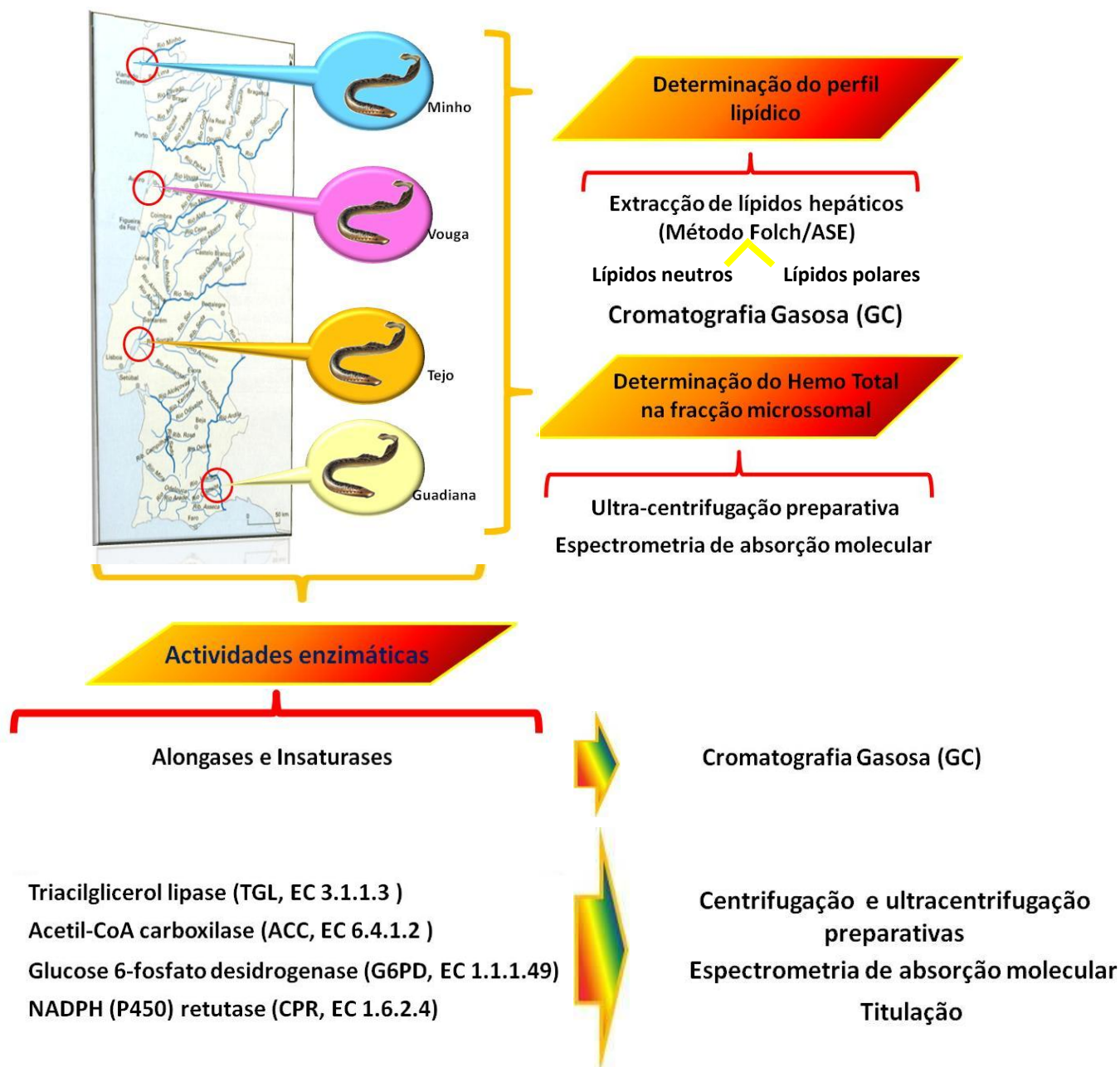
A determinação da actividade enzimática desta flavoproteína microsomal foi efectuada de acordo com o método de Peterson (1978) e Lake (1987), utilizando o citocromo c como aceitador artificial de electrões, uma vez que a sua forma ferrosa possui um máximo de absorção a 550 nm. Incubaram-se alíquotas de 0,3 mL de fracção microsomal com uma concentração aproximada de proteínas de 1,5 mg/mL sendo o meio de incubação constituído por citocromo c (0,125 mM), cianeto de potássio (15 mM) e NADPH (10 mM) diluídos em 0,9 mL de tampão fosfato (0,1 M) pH 7,6. Iniciou-se a reacção com a adição do NADPH, após pré-incubação dos restantes constituintes da mistura de ensaio durante 3 min a 37°C. Registou-se, então, a variação de absorvência ao longo do tempo durante 120 s, a 550 nm, lida contra um branco de composição idêntica à das células de leitura mas onde a solução de NADPH foi substituída por igual volume de solução tampão fosfato de 0,1 M pH 7,6. Determinou-se o valor dos coeficientes angulares das rectas obtidas (Figura E1) e a partir deles calculou-se a actividade enzimática específica por mg de proteína, utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar  $21 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (Lake, 1987; McCallum, 1992; Weber e Waxman, 1993) para a forma ferrosa do citocromo c.

#### **3.2.7.5. Alongases e insaturases**

As actividades  $\delta 6$  e  $\delta 9$ , insaturases/alongases de ácidos gordos foram estimadas utilizando a razão produto/precursor C20:22:3 $\omega$ 3/C18:3 $\omega$ 3, C22:5 $\omega$ 3/C20:5 $\omega$ 3, C16:1 $\omega$ 9/C16:0, C18:1 $\omega$ 9/C18:0 e C22:6 $\omega$ 3/C20:5 $\omega$ 3 de acordo com Cinci (2000), Warensjo (2009) e Bandarra (2004) para os lípidos polares e neutros.



### 3.3. Diagrama do trabalho



### 3.5. Equipamento

- ASE, Accelerated Solvent Extractor (ASE 100)
- Balança (Mettler AE 200)
- Balança (Sartorius BP 210S)
- Cromatógrafo Hewlett Packard HP 6890 Series GC com software HPChem (2002)
- Espectrómetro de absorção molecular (U-2001)
- Homogeneizador tipo Potter (TRI-R STIR-R, modelo K41, 500- 11000 rpm)
- Placa de aquecimento (Thermolyne Type 17600 Dri-bath)
- Evaporador rotativo (Heidolph WB 2000)
- Supercentrífuga (Hermle Z323K)
- Ultracentrífuga (Beckman Optima LE-80K)
- Vórtex (Heidolph REAX 2000)

### 3.6. Reagentes

- Acetilcoenzima A, 94%, Sigma, St. Louis
- Ácido 4-2-hidroxiethyl-1-piperazinaetanosulfónico, 99,5%, Sigma-Aldrich, St. Louis
- Ácido ascórbico, 99%, Fluka, Steetze
- Ácido clorídrico, 37%, Merck, Darmstadt
- Ácido etilenodiaminotetracético, 99%, Merck, Darmstadt
- Ácido etilenoglicoltetracético, 97%, Sigma, Steinheim
- Ácido sulfúrico, 95-97%, Fluka, Steetze
- Adenosina trifosfato, 98%, Acros Organics, New Jersey
- Albumina de soro bovino, SAFC, St. Louis
- Cianeto de potássio, VWR Prolabo, Carnaxide
- Citocromo c, Merck, Darmstadt
- Citrato de sódio, Riedel-deHaën, Hanove
- Cloreto de magnésio hexahidratado, Riedel-deHaën, Hanove
- Cloreto de potássio, Merck, Darmstadt
- Clorofórmio, Sigma-Aldrich, St. Louis
- Diclorometano, Panreac, Barcelona
- Di-terc-butil metil fenol, Supelco, Bellefonte
- Ditionito de sódio, 88%, Sigma, Steinheim
- Duodecilsulfato de sódio, 99%, Sigma, Steinheim
- Éter de petróleo, Panreac, Barcelona
- Ferrocianeto de potássio, Sigma, Steinheim



- Floreto de potássio, 99,5%, Fluka, Steetze
- Fluoreto de fenilmetilsulfonil, 99%, Fluka, Steetze
- Dinucleótido de nicotinamida e adenina fosfato (dissódico), 97,8%, Calbiochem, La Jolla
- Dinucleótido de nicotinamida e adenina fosfato de, 98%, Sigma, Steinheim
- Glucose-6-fosfato, Sigma, Steinheim
- Goma acácia, Sigma, Steinheim
- Hidrofenofosfato de potássio, 99,5%, Merck, Dramstadt
- Hidrogenofosfato de sódio, 99%, Merck, Dramstadt
- Hidrogenocarbonato de sódio, 99,5%, Sigma, Steinheim
- Hidróxido de sódio, 98%, Panreac, Barcelona
- Metanol, Sigma-Aldrich, St. Louis
- Molibdato de amónio, Riedel-deHaën, Hanove
- Piridina, VWR Prolabo, Carnaxide
- Terra Diatomáceas, Dionex, Sunnyvale
- Trifluoreto de boro, 10%, Fluka, Steinheim
- Tris(hidroximetil)aminometano, Acros Organics, New Jersey



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Caracterização dos animais

Neste trabalho utilizaram-se 10 exemplares de lampreia marinha (*Petromyzon marinus* L.) por cada bacia em estudo: Minho, Vouga, Tejo e Guadiana para caracterizar o perfil da composição em ácidos gordos dos lípidos neutros e polares do fígado, assim como, das actividades enzimáticas reguladoras da lipogénese, da lipólise, alongases, insaturases e de biotransformação do retículo endoplasmático do tecido hepático, tendo em vista caracterizar fenotipicamente os agnatas em estudo.

Assim, as características biométricas dos animais utilizados foram determinadas e encontram-se no Quadro 2.

**Quadro 2** – Características biométricas dos animais em estudo (os valores correspondem a n=10; Média±SE).

Guadiana			Tejo			Vouga			Minho		
CT (mm)	PT (g)	Sexo	CT (mm)	PT (g)	Sexo	CT (mm)	PT (g)	Sexo	CT (mm)	PT (g)	Sexo
808	1051	F	873	1251	M	801	897	M	941	1384	M
859	1088	F	934	1455	F	819	886	F	909	1319	M
818	912	F	909	1432	M	903	1333	M	861	1311	F
819	1133	F	929	1322	M	847	1108	M	925	1300	M
919	1343	F	922	1348	F	883	1180	F	789	1026	M
878	1107	M	913	1381	M	844	1074	F	950	1806	M
967	1469	M	918	1450	F	922	1402	M	877	1335	F
904	1303	M	900	1247	M	639	991	M	869	1159	F
833	1106	M	901	1220	F	833	1023	F	906	1368	F
828	933	M	878	1208	M	876	1365	M	902	1295	M
Média (± se)		Ratio sexo	Média (± se)		Ratio sexo	Média (± se)		Ratio sexo	Média (± se)		Ratio sexo
863 (±53)	1145 (±178)	1	908 (±20)	1331 (±96)	1,5	837 (±79)	1126 (±189)	1,5	893 (±47)	1331 (±198)	1,5

Os resultados das características biométricas apresentados foram ainda submetidos a análise estatística que mostrou a existência de diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para o comprimento total (CT) entre os animais do Tejo e do Vouga (Quadro A1) e para o peso total (PT) entre os animais do Tejo e Vouga, bem como, entre os animais do Vouga e Minho (Quadro A1). Observou-se ainda que as lampreias mais pequenas foram

capturadas na bacia hidrográfica do Vouga com um comprimento médio de 837 mm e com um peso médio de 1126 g, enquanto as maiores foram capturadas na bacia hidrográfica do Tejo com um comprimento médio de 908 mm e com um peso médio de 1331 g.

#### **4.2. Determinação do perfil em ácidos gordos**

O perfil dos ácidos gordos dos lípidos neutros e polares do fígado encontra-se registado no Quadro 3.

De modo geral, os indivíduos das quatro bacias hidrográficas apresentaram um perfil idêntico de ácidos gordos, no qual se verificou que os monoinsaturados foram os mais representativos (40,79 %-56,26 %) sendo seguidos pela classe dos ácidos gordos saturados (33,67 %-45,33 %) e por último pela classe dos ácidos gordos polinsaturados (4,36 %-17,12 %) quer ao nível dos lípidos neutros quer dos lípidos polares. Contudo, para a classe dos polinsaturados verificou-se uma maior oscilação de valores quer para a fracção neutra quer para a fracção polar. Os animais da bacia hidrográfica do Guadiana revelaram os valores mais elevados de ácidos gordos polinsaturados na fracção neutra (17,1 %). A nível da fracção polar os valores foram mais homogéneos tendo variado entre um mínimo de 6,1% e um máximo de 10,76%. Os ácidos gordos polinsaturados mais representativos foram os  $\omega 3$  nomeadamente o C22:6 $\omega 3$  (DHA), o C20:5 $\omega 3$  (EPA) e o C22:5 $\omega 3$  (DPA).

Os nossos resultados revelaram ainda que a proporção dos três ácidos referidos anteriormente oscilou entre 54,7 % e 83,2 % do total de polinsaturados sendo maior na fracção neutra do fígado. A percentagem de EPA e DHA demonstra a dominância do DHA sobre o EPA (DHA/EPA). A razão DHA/EPA é maior na fracção polar do que na fracção neutra com a excepção para as lampreias da bacia hidrográfica do Minho.

A proporção de  $\omega 3$  em relação  $\omega 6$  ( $\omega 3/\omega 6$ ) encontra-se igualmente expressa no Quadro 3, distanciando-se muito dos valores desta razão revelado pelos animais marinhos, os quais oscilam entre 4,7 e 14,4 (Hendersen e Tocher, 1987). Contudo, os valores referenciados pelos autores anteriores são geralmente característicos dos triacilglicerois da musculatura e portanto muito influenciados pela dieta.

**Quadro 3 – Ácidos gordos identificados (neutros e polares) nos animais em estudo para as bacias hidrográficas do Guadiana, Tejo, Vouga e Minho.**

Ácidos Gordos	LN				LP			
	Guadiana	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Tejo	Vouga	Minho
C8:0	-----	0,004±0,007	0,010±0,009	0,007±0,010	-----	-----	-----	-----
C10:0	1,230±1,2	0,814±0,749	0,903±0,678	0,647±0,518	0,158±0,142	0,357±0,170	0,322±0,243	0,261±0,145
C11:0	-----	0,005±0,008	0,008±0,008	0,003±0,008	-----	-----	-----	-----
C12:0	0,338±0,185	0,460±0,119	0,551±0,396	0,615±0,249	0,203±0,174	0,352±0,080	0,335±0,131	0,418±0,097
C13:0	0,413±1,032 <sup>*cd</sup>	0,057±0,093 <sup>*cd</sup>	1,552±0,917 <sup>*ab</sup>	1,306±0,937 <sup>*ab</sup>	-----	0,154±0,289	0,274±0,163	0,156±0,141
C14:0	8,766±2,677	11,757±2,335	13,417±5,813	13,734±6,492	7,201±3,439	8,530±1,134	8,824±2,469	9,049±1,799
C15:0	0,044±0,031	0,096±0,212	0,075±0,048	0,008±0,021	0,037±0,049	0,077±0,146	0,060±0,036	-----
C16:0	21,137±5,529	22,620±1,749	21,242±6,112	19,322±6,889	25,230±8,277	18,168±2,688 <sup>*c</sup>	29,238±9,606 <sup>*b</sup>	23,247±6,057
C17:0	0,086±0,057 <sup>*c</sup>	0,050±0,097	0,001±0,002 <sup>*ad</sup>	0,090±0,062 <sup>*c</sup>	0,060±0,075	0,042±0,094	0,051±0,042	0,010±0,031
C18:0	2,008±1,524	2,494±1,092	2,009±2,134	1,330±0,855	10,473±4,346 <sup>*bd</sup>	4,437±0,627 <sup>*ac</sup>	7,913±2,675 <sup>*b</sup>	5,806±1,370 <sup>*a</sup>
C20:0	0,142±0,299	0,174±0,115	0,163±0,147	0,064±0,063	0,526±0,178	0,418±0,200	0,392±0,237	0,047±0,100
C22:0	0,291±0,349	0,200±0,243	0,137±0,127	0,077±0,094	0,374±0,352	-----	0,309±0,183	0,392±0,224
C23:0	0,466±0,441	0,111±0,167	0,070±0,139	0,166±0,315	0,567±0,387	0,715±0,431	0,157±0,118	0,302±0,534
C24:0	0,289±0,302	0,055±0,069	0,206±0,165	0,106±0,109	0,500±0,363	0,481±0,416	0,259±0,252	0,662±0,408
Σ SFA	35,21	38,90	40,34	37,47	45,33	33,67	48,13	40,35
MUFA								
C14:1	0,583±0,305	0,701±0,133	0,932±0,635	0,960±0,351	0,275±0,206	0,469±0,189	0,385±0,214	0,502±0,131
C15:1	0,002±0,005 <sup>*d</sup>	-----	0,010±0,015	0,012±0,012 <sup>*a</sup>	-----	-----	-----	-----
C16:1	28,664±9,093	33,869±5,251	34,905±6,165	30,206±11,547	18,092±4,045 <sup>*b</sup>	25,353±1,563 <sup>*ac</sup>	19,780±4,338 <sup>*b</sup>	21,584±3,961
C17:1	0,183±0,061	0,174±0,296	0,245±0,157	0,055±0,078	0,155±0,194	0,149±0,378	0,068±0,077	0,158±0,103
C18:1ω9c	15,063±8,047	19,882±6,455	15,069±10,128	22,330±12,826	20,006±3,115	22,806±1,273	17,813±2,675	19,982±3,581

C20:1 $\omega$ 9	0,541 $\pm$ 0,376	0,974 $\pm$ 0,851	0,644 $\pm$ 0,385	0,257 $\pm$ 0,293	0,951 $\pm$ 0,492 <sup>*d</sup>	1,325 $\pm$ 0,672 <sup>*d</sup>	1,027 $\pm$ 0,367 <sup>*d</sup>	0,572 $\pm$ 0,159 <sup>*bcd</sup>
C22:1 $\omega$ 9	0,520 $\pm$ 0,423	0,246 $\pm$ 0,259	0,400 $\pm$ 0,148	0,291 $\pm$ 0,279	0,537 $\pm$ 0,287 <sup>*c</sup>	0,559 $\pm$ 0,218 <sup>*c</sup>	0,215 $\pm$ 0,079 <sup>*abd</sup>	0,611 $\pm$ 0,192 <sup>*c</sup>
C24:1 $\omega$ 9	0,969 $\pm$ 0,848	0,414 $\pm$ 0,332	0,589 $\pm$ 0,480	0,433 $\pm$ 0,260	1,227 $\pm$ 0,672	1,461 $\pm$ 0,721	1,499 $\pm$ 1,393	0,702 $\pm$ 0,579
$\Sigma$ MUFA	46,53	56,26	52,79	54,54	41,24	52,12	40,79	44,11
PUFA								
C18:2 $\omega$ 6	0,438 $\pm$ 0,116	0,516 $\pm$ 0,366	0,591 $\pm$ 0,426	0,426 $\pm$ 0,153	0,129 $\pm$ 0,105	0,175 $\pm$ 0,031	0,166 $\pm$ 0,076	0,273 $\pm$ 0,102
C18:3 $\omega$ 6	0,123 $\pm$ 0,167	0,010 $\pm$ 0,017	0,019 $\pm$ 0,021	0,034 $\pm$ 0,0473	-----	-----	-----	0,030 $\pm$ 0,063
C18:3 $\omega$ 3	0,170 $\pm$ 0,144	0,044 $\pm$ 0,045	0,070 $\pm$ 0,032	0,079 $\pm$ 0,062	0,046 $\pm$ 0,069 <sup>*cd</sup>	0,046 $\pm$ 0,064 <sup>*cd</sup>	0,071 $\pm$ 0,089 <sup>*ab</sup>	0,064 $\pm$ 0,076 <sup>*ab</sup>
C20:2	0,455 $\pm$ 0,865	0,174 $\pm$ 0,273	0,052 $\pm$ 0,087	0,074 $\pm$ 0,076	1,156 $\pm$ 1,629 <sup>*c</sup>	1,255 $\pm$ 1,09 <sup>*c</sup>	0,032 $\pm$ 0,037 <sup>*ab</sup>	0,076 $\pm$ 0,187
C20:3 $\omega$ 6	0,307 $\pm$ 0,291	0,085 $\pm$ 0,126	0,089 $\pm$ 0,111	0,095 $\pm$ 0,123	0,168 $\pm$ 0,240	0,428 $\pm$ 0,330	0,006 $\pm$ 0,007	0,454 $\pm$ 0,889
C20:3 $\omega$ 3	0,106 $\pm$ 0,248	0,020 $\pm$ 0,022	0,189 $\pm$ 0,235	0,085 $\pm$ 0,111	0,058 $\pm$ 0,162	0,108 $\pm$ 0,162	1,505 $\pm$ 1,092	2,110 $\pm$ 2,444
C20:4 $\omega$ 6	2,335 $\pm$ 0,806 <sup>*bcd</sup>	0,637 $\pm$ 0,383 <sup>*a</sup>	0,128 $\pm$ 0,072 <sup>*a</sup>	0,351 $\pm$ 0,712 <sup>*a</sup>	1,714 $\pm$ 1,955	1,781 $\pm$ 0,914	-----	0,146 $\pm$ 0,209
C20:5 $\omega$ 3 (EPA)	3,468 $\pm$ 1,287 <sup>*bcd</sup>	0,720 $\pm$ 0,396 <sup>*ad</sup>	1,278 $\pm$ 1,060 <sup>*a</sup>	1,933 $\pm$ 1,743 <sup>*ab</sup>	1,732 $\pm$ 2,395	1,334 $\pm$ 0,482	1,130 $\pm$ 0,464	2,574 $\pm$ 2,117
C22:2	0,051 $\pm$ 0,145 <sup>*bd</sup>	0,078 $\pm$ 0,061 <sup>*ac</sup>	0,048 $\pm$ 0,066 <sup>*b</sup>	0,081 $\pm$ 0,118 <sup>*a</sup>	0,650 $\pm$ 0,436	0,601 $\pm$ 0,587	0,100 $\pm$ 0,181	0,308 $\pm$ 0,742
C22: 5 $\omega$ 3	4,593 $\pm$ 2,160 <sup>*bcd</sup>	1,017 $\pm$ 0,537 <sup>*a</sup>	1,560 $\pm$ 1,249 <sup>*a</sup>	1,739 $\pm$ 1,357 <sup>*a</sup>	1,662 $\pm$ 1,682	2,034 $\pm$ 0,918	1,220 $\pm$ 0,507	2,213 $\pm$ 1,521
C22:6 $\omega$ 3 (DHA)	5,069 $\pm$ 2,430 <sup>*bcd</sup>	1,058 $\pm$ 0,591 <sup>*a</sup>	1,874 $\pm$ 1,470 <sup>*a</sup>	2,395 $\pm$ 2,034 <sup>*a</sup>	1,995 $\pm$ 2,428	1,931 $\pm$ 0,633	1,856 $\pm$ 1,222	2,509 $\pm$ 1,928
$\Sigma$ PUFA	17,12	4,36	5,90	7,29	9,31	9,69	6,09	10,76
$\Sigma$ UNSAT	63,65	60,62	58,69	61,83	50,55	61,81	46,88	54,87
$\Sigma$ SAT/ $\Sigma$ UNSAT	0,55	0,64	0,69	0,61	0,90	0,54	1,03	0,74
$\Sigma$ $\omega$ 3	13,41	2,86	4,97	6,23	5,49	5,45	5,78	9,47
$\Sigma$ $\omega$ 6	3,20	1,25	0,83	0,91	2,01	2,38	2,0	0,90
$\Sigma$ $\omega$ 3/ $\Sigma$ $\omega$ 6	4,19	0,22	5,99	6,88	2,73	2,29	2,89	10,52
DHA/EPA	1,46	1,47	1,47	1,24	1,15	1,45	1,64	0,97

Com vista a identificar qual das variáveis independentes (género ou bacia hidrográfica) diferenciavam o perfil dos ácidos gordos dos lípidos polares e neutros do fígado foi realizado uma MANOVA.

Os testes multivariados revelaram que o género não exercia efeito significativo ( $p > 0,05$ ) na composição relativa dos ácidos gordos dos lípidos neutros do fígado enquanto o factor bacia hidrográfica desempenhava um efeito altamente significativo ( $p < 0,001$ ) no perfil lipídico dos lípidos neutros. A interacção género\*bacia hidrográfica não revelou qualquer efeito significativo no perfil de ácidos gordos dos lípidos neutros. Quer o género quer a interacção género\*bacia hidrográfica também não revelaram qualquer efeito significativo ( $p > 0,05$ ) para o perfil em ácidos gordos dos lípidos polares do fígado, sendo novamente a bacia hidrográfica o factor determinante.

Ao nível do perfil dos ácidos gordos dos lípidos neutros observaram-se diferenças significativas entre os animais das várias bacias hidrográficas (Quadro 3). Para as classes de ácidos gordos saturados e monoinsaturados apenas os ácidos gordos de cadeia ímpar revelaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). As diferenças mais interessantes foram, contudo, verificadas para a classe dos ácidos gordos polinsaturados, observando-se que os animais do Guadiana apresentaram as maiores proporções relativas de C20:4 $\omega$ 6; C20:5 $\omega$ 3; C22:5 $\omega$ 3 e C22:6 $\omega$ 3.

Ao nível da fracção polar observou-se que os ácidos gordos saturados C16:0 e C18:0 apresentaram valores significativamente mais baixos ( $p < 0,05$ ) nos animais do Tejo quando comparados com os animais do Vouga. Ao nível dos monoinsaturados observou-se que o C16:1 registou valores mais elevados para as lampreias do Tejo quando comparadas com os animais do Vouga e do Guadiana e os animais do Minho caracterizaram-se pelos valores mais baixos de C20:1 $\omega$ 9 enquanto os animais do Vouga registaram o valor mais baixo de C22:1 $\omega$ 9. Ao nível dos ácidos gordos polinsaturados as diferenças significativas registaram-se apenas para o C18:3 $\omega$ 3, caracterizando-se os animais do Tejo e Guadiana pelos valores mais baixos quando comparados com os animais do Vouga e do Minho.

Os nossos resultados evidenciam que os ácidos gordos saturados mais característicos foram o C16:0 e o C14:0 e os ácidos gordos monoinsaturados mais representativos foram o C16:1 e o C18:1 $\omega$ 9 o que está de acordo com trabalhos prévios (Pinela, 2009). O C16:0 é uma fonte de energia metabólica potencial para a maior parte dos peixes durante o crescimento e, particularmente, na formação das gónadas nas fêmeas (Henderson, 1984). O ácido gordo C18:1 $\omega$ 9 é igualmente uma importante fonte de energia metabólica e estudos de McKenzie (1998) têm sugerido que os ácidos gordos em C18:0 são mais importantes que os polinsaturados para o fornecimento de energia para os músculos envolvidos no processo de natação durante as migrações. Por outro lado, o C18:1 $\omega$ 9

encontra-se também associado a elevados graus de carnívoros (Dalsgaard, 2003) e, atendendo a que durante a fase parasítica do seu ciclo de vida, as lampreias consomem sangue e tecido muscular de animais marinhos durante pelos menos 24 meses, isto poderá explicar as elevadas percentagens de C18:1 $\omega$ 9 encontradas.

As elevadas proporções de C20:5 $\omega$ 3; C22:5 $\omega$ 3 e C22:6 $\omega$ 3 registadas na fracção neutra dos animais do Guadiana remetem para a importância da conservação destes ácidos como fonte energética para o processo reprodutivo (Tocher, 2003). A elevada proporção de C20:4 $\omega$ 6 poderá indiciar a importância deste ácido como precursor de eicosanóides (Tocher e Sargent, 1987), podendo ser mobilizado da fracção neutra para a fracção polar.

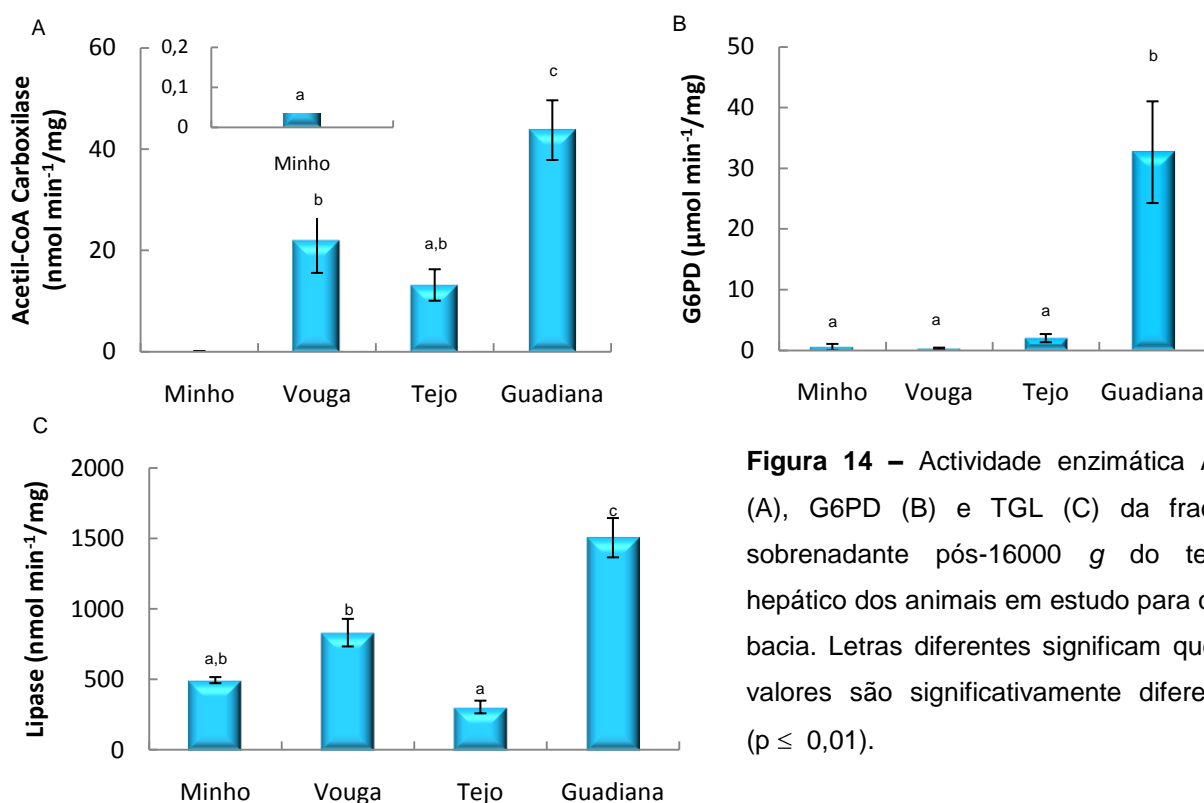
### **4.3. Análise quantitativa das fracções sub-celulares**

#### **4.3.1. Perfil de actividades enzimáticas**

Considerando que as actividades enzimáticas, lipolíticas e/ou lipogénicas estão intimamente relacionadas com modificações fisiológicas na metamorfose de lampreias considerou-se neste estudo que seria espectável o mesmo acontecer com as lampreias no início da sua fase de migração reprodutiva e que essas alterações poderiam ser correlacionadas com fontes nutricionais e/ou modificações fisiológicas subsequentes (Kao, 1997; Kao, 1999; Sheridan, 1998). Pelas razões expostas anteriormente, seleccionaram-se para análise cinco actividades enzimáticas hepáticas: (i) TGL, enzima regulador do catabolismo lipídico; (ii) ACC, enzima regulador da biossíntese *de novo* nos vertebrados; (iii) G6PD, regulador da via das pentose fosfato que gera equivalentes redutores sob a forma de NADPH, necessários às vias biossintéticas; (iv) alongases e (v) insaturases, devido ao seu papel nas modificações de resíduos acilo provenientes da dieta e/ou biossíntese *de novo* (Capellini, 2008; Brownsey, 2006; Pokalof, 2010).

A Figura 14A mostra-nos que a expressão funcional do enzima lipogénico ACC apresenta maiores diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre os animais da bacia do Minho e Guadiana (510 x superior). Por outro lado, os animais da bacia do Vouga e Tejo também diferem significativamente das lampreias do Guadiana (2 x e 3 x respectivamente), mas não diferem entre si. Podemos observar ainda diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre os animais do Minho e Vouga (260 x). Deste modo, em termos de actividade acetil-CoA carboxilase é possível separar os animais do Guadiana dos animais de todas as outras bacias, bem como os animais do Vouga e Tejo dos animais do Minho, mostrando-se uma distribuição homogénea dos resultados nos indivíduos de cada grupo.





**Figura 14** – Actividade enzimática ACC (A), G6PD (B) e TGL (C) da fracção sobrenadante pós-16000 g do tecido hepático dos animais em estudo para cada bacia. Letras diferentes significam que os valores são significativamente diferentes ( $p \leq 0,01$ ).

A disponibilização de equivalentes redutores pela via das pentoses fosfato pode ser inferida a partir da Figura 14B. Nesta podemos observar uma diferença altamente significativa ( $p < 0,001$ ) desta actividade catalítica expressa nos animais do Guadiana, relativamente à determinada em qualquer das outras bacias, onde se revelou 63 x superior à do Minho, 129 x superior à do Vouga e 16 x superior à do Tejo. Em contrapartida, não foram detectadas diferenças significativas entre os animais das restantes bacias, que apresentaram em qualquer dos casos homogeneidade estatística no interior de cada grupo.

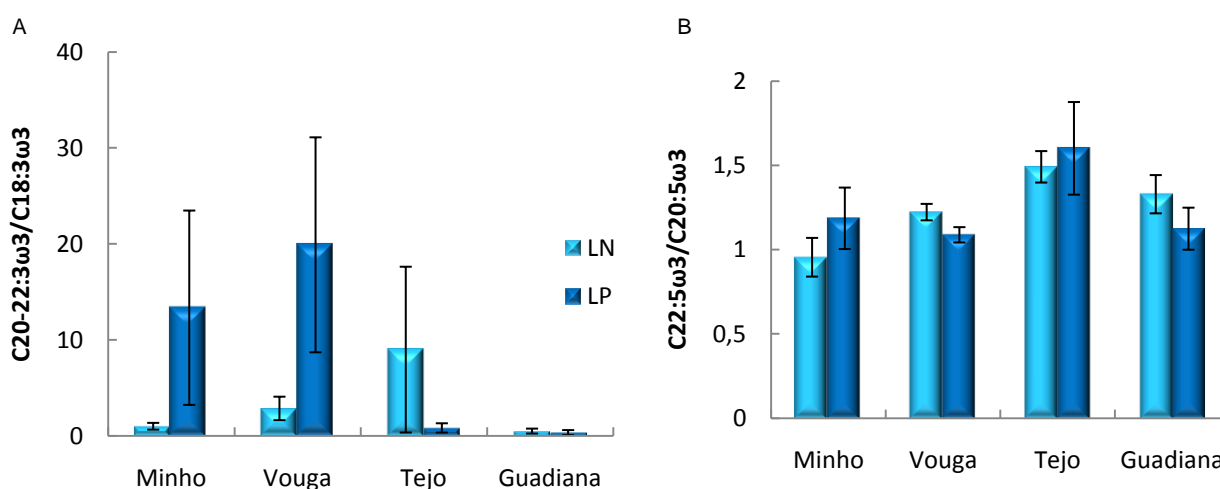
Os resultados descritos nas Figuras 14A e B sugerem uma interacção metabólica entre os enzimas biogénicos analisados apontando para uma maior capacidade de biossíntese de ácidos gordos nas lampreias da bacia do Guadiana.

A partir da Figura 14C podemos observar que a actividade TGL das lampreias da bacia do Guadiana distingue-se significativamente ( $p < 0,01$ ) das actividades TGL dos animais das restantes bacias. Contudo, a actividade TGL nas lampreias do Vouga diferencia-se significativamente da mesma actividade catalítica expressa nos animais do Tejo, não diferindo da actividade TGL dos animais do Minho. Acrescente-se ainda, que os animais do Tejo não diferem estatisticamente dos animais do Minho, e que os animais do Tejo e do Guadiana foram os que se distanciaram mais. Assim, a via lipolítica mostrou-se

mais activa nas lampreias da bacia do Guadiana. No entanto, os animais da bacia do Vouga também apresentaram actividade lipogénica e lipolítica estatisticamente distinta da que é observada nos animais do Minho e do Tejo. Pode-se então postular que a segregação metabólica evidenciada nos animais do Guadiana, e menos óbvia, nos animais do Vouga possa ter sido condicionada pela dieta adoptada por cada grupo, na sua fase parasitária, altura em que depositaram triacilgliceróis no músculo para mobilização energética a longo prazo, nomeadamente, durante a fase de migração reprodutiva.

#### 4.3.2. Alongases e insaturases e funções do retículo endoplasmático

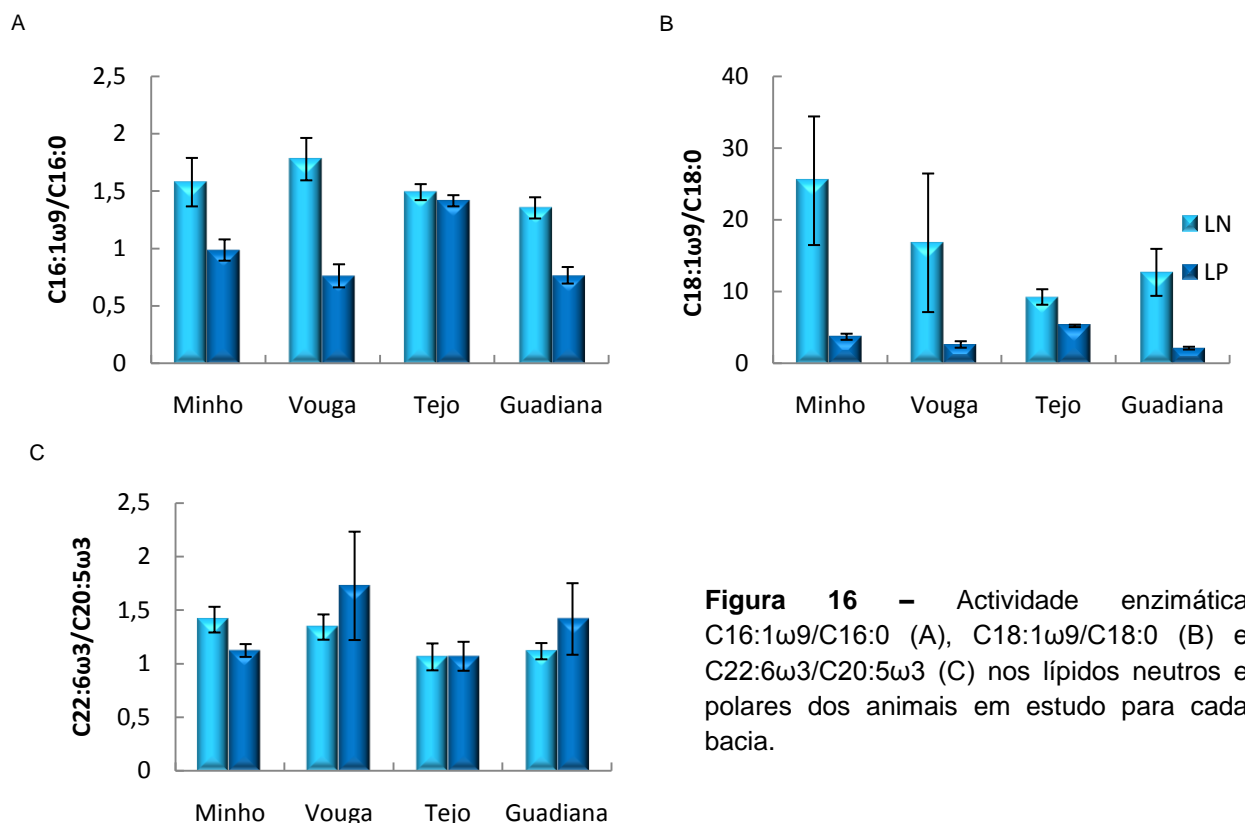
As Figuras 15 e 16 mostram que não se detectaram diferenças significativas nas actividades enzimáticas alongases  $C22:5\omega3/C20:5\omega3$  e  $C20-22:3\omega3/C18:3\omega3$ , alongase/insaturase  $C22:6\omega3/C20:5\omega3$ , bem como, entre as actividades enzimáticas insaturases  $C16:1\omega9/C16:0$  e  $C18:1\omega9/C18:0$ , estimadas pela razão produto/precursor de ácidos gordos neutros e polares nas lampreias das quatro bacias estudadas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 15** – Actividade enzimática de alongases  $C20-22:3\omega3/C18:3\omega3$  (A) e  $C22:5\omega3/C20:5\omega3$  (B) nos lípidos neutros e polares dos animais em estudo para cada bacia.

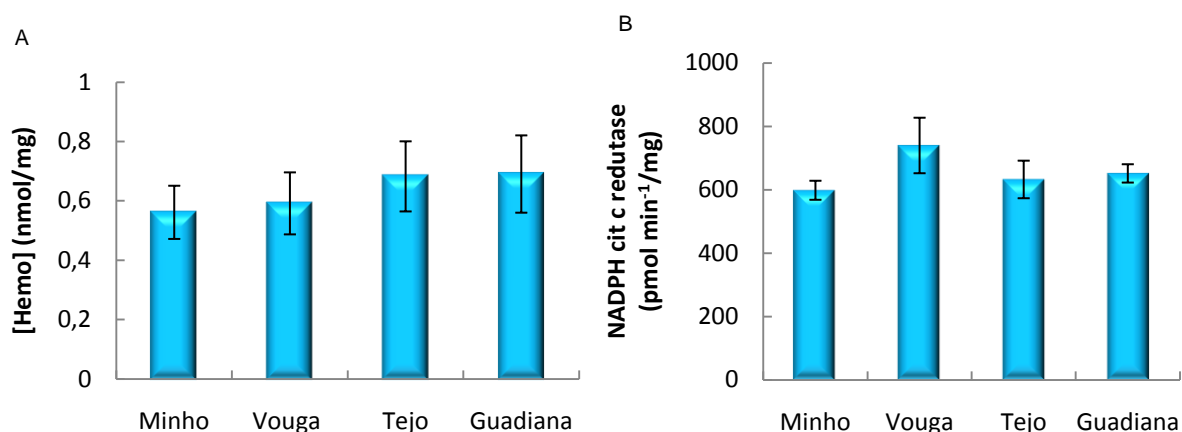
Por outro lado, podemos observar ainda que apenas a actividade  $C20-22:3\omega3/C18:3\omega3$  calculada a partir dos ácidos gordos de lípidos polares, apresentou valores muito superiores a 1, enquanto as restantes actividades insaturases e alongases apresentaram valores à volta de 1, o que significa níveis de actividade muito baixos. De acordo com March (1993) podemos assumir que nos animais das bacias do Minho, Tejo, Vouga e Guadiana estariam a ocorrer lesões degenerativas nas vísceras e erosão de

barbatanas e brânquias acompanhadas por dificuldade adaptativa à temperatura ambiental devido a produção residual de C22:5 $\omega$ 3, C22:6 $\omega$ 3; C16:1 $\omega$ 9 e C18:1 $\omega$ 9, resposta que nos permite inferir que em termos moleculares as lampreias das quatro bacias estudadas estariam no mesmo estado de desenvolvimento.



**Figura 16** – Actividade enzimática C16:1 $\omega$ 9/C16:0 (A), C18:1 $\omega$ 9/C18:0 (B) e C22:6 $\omega$ 3/C20:5 $\omega$ 3 (C) nos lípidos neutros e polares dos animais em estudo para cada bacia.

Considerando que as actividades enzimáticas alongases e insaturases, localizadas no reticulo endoplasmático, de células hepáticas são activadas por uma cadeia de transporte de electrões membranar - que envolve o citocromo b<sub>5</sub> e a actividade NADH b<sub>5</sub> redutase e que a actividade NADPH citocromo c (P450) redutase assiste ao funcionamento do sistema citocromo P450, de desintoxicação celular, e que por outro lado é um bom marcador da função do retículo endoplasmático - existiu a preocupação de avaliar se registavam diferenças significativas no conteúdo hemático da fracção microssomal, eventualmente correlacionável com a resposta das alongases e/ou insaturases discutida anteriormente.



**Figura 17** – Concentração do hemo (A) da fracção microssomal e actividade enzimática NADPH (P450) reductase (B) da fracção sobrenadante pós-16000 g do tecido hepático dos animais em estudo para cada bacia.

Os resultados apresentados na Figura 17 mostram que não se determinaram diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) no conteúdo hemático da fracção microssomal. Pode-se acrescentar ainda que se detectou actividade catalítica NADPH citocromo c (P450) reductase em níveis de expressão funcional descritos na literatura consultada, facto que confirma a integridade da fracção microssomal preparada. Contudo, também não foram detectadas diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) desta actividade catalítica nas lampreias das quatro bacias estudadas.

## 5. CONCLUSÕES

O perfil em ácidos gordos dos lípidos neutros e polares do fígado não revelou diferenças significativas entre géneros, mas mostrou uma distinção significativa entre os animais das várias bacias hidrográficas. É de referir ainda que diferenças significativas foram observadas no perfil de lípidos neutros dos animais da bacia do Guadiana relativamente às lampreias de outras bacias, sendo os ácidos gordos que apresentaram uma maior proporção relativa os C20:4 $\omega$ 6; C20:5 $\omega$ 3; C22:5 $\omega$ 3 e C22:6 $\omega$ 3.

A actividade catalítica do ACC apresentou diferenças significativas entre as quatro bacias em estudo, tendo-se destacado os animais da bacia do Guadiana dos animais das restantes bacias. Contudo, no segundo grupo também se observam diferenças entre os animais do Vouga e Tejo semelhantes entre si, mas que diferem das lampreias do Minho.

A actividade G6PD também diferencia significativamente ( $p < 0,01$ ) os animais do Guadiana dos indivíduos das outras bacias. No entanto, não cria sub-grupos entre os animais das bacias Minho, Tejo e Vouga como observado com a actividade catalítica biogénica ACC.

A actividade enzimática TGL das lampreias da bacia do Guadiana distinguiu-se significativamente da detectada nos animais das restantes bacias. Todavia, as actividades TGL permitem distinguir um subgrupo constituído pelas lampreias do Minho e Vouga das lampreias do Tejo, facto que aponta para maior actividade lipolítica nos animais destas duas bacias.

No que diz respeito às actividades alongases e insaturases não se observou diferenças significativas nas actividades de alongases C22:5 $\omega$ 3/C20:5 $\omega$ 3 alongase/insaturase C22:6 $\omega$ 3/C20:5 $\omega$ 3, bem como, entre as actividades C16:1 $\omega$ 9/C16:0 e que exibiram valores residuais, facto que permite inferir uma taxa muito baixa de produção de C22:5 $\omega$ 3, C22:6 $\omega$ 3 e C16:1 $\omega$ 9 indicadores da ocorrência lesões degenerativas e dificuldades adaptativas à diferença de temperatura, características fisiológicas correlacionáveis com o estágio de desenvolvimento das lampreias em estudo.

O conteúdo em hemo microsomal hepático também não permitiu detectar diferenças significativas entre os indivíduos das quatro bacias estudadas, perfil que está de acordo com a maior parte das actividades alongases e insaturases detectadas no retículo

endoplasmático indiciador de pouca modificação de lípidos da dieta, característica comum em lampreias em fase inicial da migração reprodutiva.

Os resultados obtidos mostraram que o perfil de lípidos neutros permitiu subdividir as lampreias em dois sub-grupos: (i) Tejo e bacias a norte deste e (ii) Guadiana. Considerando que os triacilgliceróis são lípidos de reserva energética acumulados ao longo da vida dos animais, pode-se supor que as diferenças detectadas, reflectem a dieta adoptada por cada grupo, em particular a da fase parasitária, tendo em conta que durante a fase migratória reprodutiva as lampreias deixam de se alimentar.

Por outro lado, os enzimas reguladores da lipólise e da lipogénese permitiram-nos de novo subdividir os indivíduos estudados em dois sub-grupos semelhantes aos que foram identificados pelo perfil dos lípidos neutros, embora neste caso, o grupo (i) possa por vezes, ser subdividido em dois novos sub-grupos: (a) Vouga e Tejo segregado do Minho ou (b) Minho e Tejo segregados do Vouga. Considerando que alterações na expressão de actividades enzimáticas reflectem factores intrínsecos do genoma, mas também da interacção do ambiente com o genoma dos animais, pode-se admitir que os sub-grupos (i) e (ii) detectados pelos dois tipos de parâmetros poderão depender de factores nutricionais. No entanto, os sub-grupos (a) e (b), embora também possam resultar da interacção dieta\*genoma, podem depender de outros factores, como características geográficas particulares de cada bacia.

Os marcadores enzimáticos e de conteúdos do reticulo endoplasmático parecem suportar a hipótese de que todos os animais se encontravam no mesmo estágio de desenvolvimento, uma vez que não se conseguiu detectar diferenças significativas nos parâmetros analisados, em que alguns deles indiciam involução funcional de alguns tecidos.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- ACKMAN, RG. (1967) Characteristics of the fatty acid composition and biochemistry of some freshwater fish oils and lipids in comparison with marine oils and lipids. *Comp.Biochem.Physiol* 22:907-22.
- ACKMAN, RG. (1999). Comparison of lipids in marine and freshwater organisms. In: Arts, M.T., Wainman, B.C. (Eds.), *Lipids in Freshwater Ecosystems*. Springer, New York, U.S.A., pp. 263-298.
- ALMAÇA C. (1990). A lampreia e o esturção na bacia do Douro – *Observatório* 1: 377-382.
- ALMAÇA C. (1995). Freshwater fish and their conservation in Portugal. *Biological Conservation* 72: 125–127.
- ALMEIDA, PR; QUINTELLA, BR, (2002b). Larval habitat of the sea lamprey (*Petromyzon marinus* L.) in the River Mondego (Portugal). In: *Freshwater fish conservation: options for the future*. Pp. 121-130.
- ALMEIDA, PR; QUINTELLA, BR; DIAS, NM; ANDRADE, N. (2002a). The anadromous sea lamprey in Portugal: Biology and conservation perspectives. Pp. 49-58 In *The biology of lampreys* (M. Moser, J.Bayer e D. Mac Kinlay, eds.), Symposium Proceedings. International Congress on the Biology of Fish. American Fisheries Society, Vancouver.
- ALMEIDA, PR; SILVA, HT; QUINTELLA, B. (2002c). The spawning migration of the sea lamprey (*Petromyzon marinus* L.) in the River Mondego. In: *Aquatic Ecology of the Mondego river basin. Global importance of local experience*. Pp. 381-386. Pardal MA, Marques JC & Graça MA (eds.). Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra.
- AMES, B.N. (1966). Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymology* 8, 115-118.
- ARUKWE, A; GOKSOYR, A. (1997). Changes in Three Hepatic Cytochrome P450 Subfamilies During a Reproductive Cycle in Turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *The Journal of Experimental Zoology* 277:313–325.
- BARAM, D; PYETAN, E; SITTNER, A; AUERBACH-NEVO, T; BASHAN, A; YONATH, A. (2005). Structure of trigger factor binding domain in biologically homologous complex with eubacterial ribosome reveals its chaperone action. *PNAS*, vol. 102(34): 12017–12022.
- BARTHOLOMAEUS, AR; BOLTON, R; AHOKAS, JT. (1994). Inhibition of rat liver cytosolic glutathione S-transferase by silibyn, *Xenobiotica* 24, 17-24.
- BEAMISH, FWH. (1980). Biology of the North American anadromous sea lamprey. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37: 1924-1943.
- BEAULATON, L.; C. TAVERNYB, G.; CASTELNAUD. (2008). Fishing, abundance and life history traits of the anadromous sea lamprey (*Petromyzon marinus*) in Europe. *Fisheries Research* 92:90–101.
- BERG, JM; TYMOCZKO, LJ; STRYER, L. (2002). *Biochemistry* 5th ed. W. H. Freeman and Company.

- BIRD, DJ; ELLIS DJ; POTTER, IC. (1993). Comparisons between the fatty acid composition of the muscle and ovary of the nonparasitic lamprey *Lampetra planeri* (Bloch) and their counterparts in the anadromous and parasitic *Lampetra fluviatilis* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 105B: 327-332.
- BIRD, DJ; POTTER, IC. (1983). Changes in the fatty acid composition of triacylglycerols and phospholipids during the life cycle of the lamprey *Geotria australis* Gray. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 75: 31-41.
- BIRD, DJ; POTTER, IC. (1983). Changes in the fatty acid composition of triacylglycerols and phospholipids during the life cycle of the lamprey *Geotria australis* Gray. *Comp. Biochem. Physiol.*, 75B: 31-41.
- BIRD, DJ; POTTER, IC; HARDISTY, MW; BAKER, BI. (1994). Morphology, body size and behaviour of recently-metamorphosed sea lampreys, *Petromyzon marinus*, from the lower river Severn and their relevance to the onset of parasitic feeding, *J. Fish Biol.* 44, pp. 67-74
- BIRO-SAUVEUR, B; EECKHOUTE, C; SUTRA, JF; CALLÉJA, C; ALVINERIE, ME; GALTIER, P. (1994). Consequences of challenge infections with *Fasciola hepatica* on rat liver P450-dependent metabolism of sex hormones, *J. steroid biochem. Mol. Boil.*, 51, 209-217.
- BROWNSEY, RW; BOONE, AN; ELLIOTT, JE; KULPA, JE; LEE, WM. (2006). Regulation of acetyl-CoA carboxylase *Biochemical Society Transactions*, 34: 223-227.
- CABRAL, MJ (COORD.); ALMEIDA, J; ALMEIDA, PR; DELLINGER, T; FERRAND DE ALMEIDA, N; OLIVEIRA, ME; PALMEIRIM, JM; QUEIROZ, AI; ROGADO, L; SANTOS-REIS, M. (eds.) (em publ.). Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal. Instituto da Conservação da Natureza, Lisboa.
- CAPPELLINI, MD; FIORELLI, G. (2008). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet* 371 (9606): 64-74.
- CASTELL, JD. (1979) Review of lipid requirements of finfish. In *Finfish nutrition and fishfeed technology*, edited by J.E. Halver and K. Trews. Proceedings of a World Symposium sponsored and supported by EIFAC/FAO/ICES/IUNS, Hamburg, 20-23 June, 1978. *Schr.Bundesforschungsanst.Fisch.,Hamb.*, (14/15) vol.1: 59-84.
- CHHABRA, SK; RAO, AR. (1994). Transmammary modulation of xenobiotic metabolizing enzymes in liver of mouse pups mace (*Myristica fragrans* Hout.), *J. Ethnopharmacol.* 42, 169-177.
- CINCI, G; GUERRANTI, R; PAGANI, R; CARLUCCI, F; TERZUOLI, L; ROSI, F; MARINELLO, E. (2000). Fatty acid composition of phospholipids, triglycerides and cholesterol in serum of castrated and estradiol treated rats, *Life Sciences*, 66, 1647-1654.
- COLLARES-PEREIRA MJ, COELHO MM & COWX IG (1995). Fishing News Books, Blackwell Science, Oxford.
- CORPAS, FJ. (1998). A dehydrogenase-mediated recycling system of NADPH in plant peroxisomes. *Biochem. J.* 330 (7): 777-784.



- COWEY, CB; SARGENT, JR. (1972). Fish nutrition. *Adv.Mar.Biol.*, 10:383-492.
- COWEY, CB; SARGENT, JR. (1977) Lipid nutrition in fish. *Comp.Biochem.Physiol.* (B Comp.Biochem.) 57:269-73.
- DAFRÉ, AL; SIES, H; AKERBOOM, T. (1996). Protein S-thiolation and regulation of microsomal glutathione transferase activity by the glutathione redox couple, *Arch. Biochem. Biophysics*, 332, 2, 288-294.
- DALSGAARD, J; ST JOHN, M; KATTNER, G; MULLER-NAVARRA, D; HAGEN, W. (2003). Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Adv. Mar. Biol.* 46: 225-340.
- DE SILVA, SS; ANDERSON, TA. (1995). Fish nutrition in aquaculture. Springer, London.
- DIAS, JÁ; FERREIRA, Ó. (2001). Projecto EMERGE – Estudo Multidisciplinar do Estuário do Rio Guadiana. Relatório Final. Relatório CIACOMAR nº 3/01, 150p.
- DIAS, NM; QUINTELA, BR; ALMEIDA, PR. (2001). Perspectivas de conservação da lampreia-marinha (*Petromyzon marinus*, L.) em Portugal. In: Actas do 2º Congresso Nacional de Conservação da Natureza. 2-5 de Outubro de 2001. Instituto da Conservação da Natureza, Lisboa.
- DOADRIO, I. (ed) (2001). Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales de España. Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- FERREIRA, MT; GODINHO, F. (2002). Comunidades biológicas de albufeiras. In: Ecossistemas Aquáticos e Ribeirinhos. *Ecologia, Gestão e Conservação*. Pp. 10.1-10.25. Moreira I, Ferreira MT, Cortes R, Pinto P& Almeida PR (eds.). Instituto da Água, Lisboa.
- FOLCH, J, LEES, M, STANLEY, GH. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1:497-509.
- FRICK, NT; BYSTRIANSKY, JS; KWONG, Y; CHEW, SF; BALLANTYNE, JS. (2008). Lipid, ketone body and oxidative metabolism in the African lungfish, *Protopterus dolloi* following 60 days of fasting and aestivation; *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A 151: 93–101.
- GURR, MI; HARWOOD, JL; FRAYN, KN. (2002). Lipid Biochemistry, 5th Edition. University of Oxford, Oxford.
- HALLIDAY, RG. (1991). Marine distribution of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*) in the Northwest Atlantic. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48:832–842.
- HALVER, JE. (1980). Aquaculture development and coordination programme. Fish feed technology. Lectures presented at the FAO/UNDP Training Course in Fish Feed Technology, Seattle, Washington.
- HARDISON, R. (1999). The Evolution of Hemoglobin: Studies of a very ancient protein suggest that changes in gene regulation are an important part of the evolutionary story. *American Scientist* 87 (2):126.

- HARDISTY, MW. (1986). *Petromyzon marinus* Linnaeus, 1758 In: The freshwaterfishes of Europe. Petromyzontiformes. Holcík J (ed.). Aula-Verlag Wiesbaden.
- HARDISTY, MW; POTTER, IC. (1971a). The behavior, ecology and growth of larval lampreys. In: M. W. Hardisty and I.C. Potter (eds.), The biology of lampreys, Vol 1, pp. 85-125. Academic Press, London.
- HARDISTY, MW; POTTER, IC. (1971b). The general biology of adult lampreys. In: M. W. Hardisty and I.C. Potter (eds.), The biology of lampreys, Vol. 1, pp. 127-247. Academic Press, London.
- HENDERSON, RJ; SARGENT, JR; HOPKINS, CCE. (1984). Changes in the content and fatty acid composition of lipid in an isolated population of the capelin, *Mallottus villosus*, during sexual maturation and spawning. *Mar. Biol.* 78, 255-263.
- HENDERSON, RJ; TOCHER, DR. (1987). *Prog. Lipid Res.* 26, 281-347
- HUYNH, MD. (2007). Comparison of fatty acid profiles of spawning and non-spawning Pacific herring, *Clupea harengus pallasi*. *Comp. Biochem. Physiol.*, B 146: 504-511.
- JUNG, K; KUHLE, S; KLOTZEK, S; BECKER, S; HENKE, W. (1993). Effect of storage temperature on the activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione S-transferase in rat liver and kidney homogenates, *Enz. Prot.*, 47, 149-155.
- KAO, Y-H; MANZON, RG; SHERIDAN, MA; YOUSON, JH. (1999). Study of relationship between thyroid hormones and lipid metabolism during KClO<sub>4</sub>-induced metamorphosis of landlocked lamprey, *Petromyzon marinus*, *Comp Biochem Physiol Part C*, 363-373.
- KAO, Y-H; YOUSON, JH; HOLMES, JA; SHERIDAN, MA. (1997). Changes in lipolysis and lipogenesis in selected tissues of the landlocked lamprey, *Petromyzon marinus*, during metamorphosis. *J. Exp. Zool.*, 277:301-312.
- KELLY, FL; KING, JJ. (2001). A review of the ecology and distribution of three lamprey species, *Lampetra fluviatilis* (L.), *Lampetra planeri* (Bloch) and *Petromyzon marinus* (L.): a context for conservation and biodiversity considerations in Ireland. *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy* 101B (3): 165-185.
- KIM, SG; CHO, JY; CHUNG, YS; AHN, E-T; LEE, K-Y; HAN, Y-B. (1998). Suppression of xenobiotic-metabolizing enzyme expression in rats by acriflavine, a protein kinase C inhibitor, *Drug Metab. Dispos.*, 26, 66-72.
- KORE, AM; JEFFERY, EH; WALLIG, MA. (1993). Effects of 1-isothiocyanato-3-(methylsulfinyl)-propane on xenobiotic metabolizing enzymes in rats, *Fd. Chem. Toxicol.* 37, 723-729.
- LAKE, BG. (1987). Preparation and characterization of microsomal fractions for studies on xenobiotic metabolism, in *Biochemical Toxicology – a practical approach*, 1st ed. IRL Press, Oxford.
- LAROSA, JC; LEVY, RI; WINDMUELLER, HG; FREDRICKSON, DS. (1972). Comparison of the triglyceride lipase of liver, adipose tissue, and postheparin plasma. *Journal of Lipid Research*, Volume 13.

- LARSEN, LO. (1980). Physiology of adult lampreys, with special regard to natural starvation, reproduction, and death after spawning. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37: 1762-1777.
- LASH, LH; XU, Y; ELFARRA, AA; DUESCHER, RJ; PARKER, JC. (1995). Glutathione-dependent metabolism of trichloroethylene in isolated liver and kidney cells of rats and its role in mitochondrial and cellular toxicity, *Drug Metabol. Dispos.* 23, 846-853.
- LI, HC; LIU, D; WAXMAN, DJ. (2001). Transcriptional induction of hepatic NADPH: cytochrome P450 oxidoreductase by thyroid hormone. *Mol Pharmacol* 59(5):987-995.
- LOUREIRO, JJ M; MACHADO, MLR. (1986a). Bacia hidrográfica do Rio Ave. *Monografias hidrológicas dos principais cursos de água de Portugal Continental*. M.P.A.T., S.EA.R.N. Direcção Geral dos Recursos e Aproveitamentos Hidráulicos.Divisão de Hidrometria, Lisboa, p.93-146.
- LOUREIRO, JJM; NUNES, MNF; MACHADO, MLR. (1986b). Bacia Hidrográfica do Rio Guadiana. In: *Monografia Hidrológicas dos Principais Cursos de Água de Portugal Continental*, p. 339-499, Direcção-Geral dos recursos e Aproveitamentos Hidráulicos, Lisboa.
- LOWE, DR; BEAMISH, FWH; POTTER, IC. (1973). Changes in the proximate body composition of the landlocked sea lamprey *Petromyzon marinus* (L.) during larval life and metamorphosis. *J. Fish Biol.*, 5: 673-682.
- LOWRY, OH; ROSENBROUGH, J; FARR, AL; RANDALL, RJ. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- LUKE, BT; LOWE, GH; MCLEAN, AD. (1987). Theoretical investigations of the anaerobic reduction of halogenated alkanes by cytochrome P450. I Structure, inversion barriers, and heats of formation of halomethyl radicals, *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 1307-1325.
- MACHADO, CJ; GALHANO, MH; BRANCO, R; CERQUEIRA, MM; GUIMARÃES, MC; COELHO, M; AFONSO, O; SANTOS, P. (1989). Relatório Final - Rio Ave. Projecto Nato Po-Rivers. Actividade D - Caracterização Biológica: 52 pp.
- MAITLAND, PS. (1995). Freshwater fish of Annexes II and IV of the EC Habitats Directive (92/43/EEC). Final report to the EC.
- MARCH, BE. (1993). Essential fatty acids in fish Physiology., *Can. J.Physiol.Pharma.*71, 684-689.
- MCCALLUM, GP; HORTON, JE; FALKNER, KC; BEND, JR. (1992). Microsomal cytochrome P450 1A1 dependent monooxygenase activity in guinea pig heart. Induction, inhibition, and increased activity by addition of exogenous NADPH-cytochrome P450 reductase, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 71, 151-156.
- McKenzie, DJ; Higgs, DA; Dosanjh, B; Deacon, G; Randall, DJ. (1998). Dietary lipid composition influences swimming performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in seawater. *Fish Physiol. Biochem.* 19, 111-122.
- MCLAREN, BA.. (1947). The nutrition of rainbow trout. 1. Studies of vitamin requirements. *Arch-Biochem.* 19:169-78

- MEED, JF; KAYAMA, M. (1967) Lipid metabolism in fish. In Fish oils, edited by M.E. Stansby. Westport, Conn., Avi Publ. Co., pp. 289-99.
- MIYAZAKI, M; NTAMBI, JM. (2008). Fatty acid desaturation and chain elongation in mammals. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (5th Edn.)* Vance, DE and Vance, JE (Eds.) Elsevier, Amsterdam.
- NICHOLS, OC; HAMILTON, PK. (2004). Occurrence of the parasitic sea lamprey, *Petromyzon marinus*, on western North Atlantic right whales, *Eubalaena glacialis*. *Environmental Biology of Fishes* 71:413–417.
- OMURA, T; SATO, R. (1964a). The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes, I. Evidence for its hemoprotein nature, *J. Biol. Chem.*, 239, 2370-2379.
- OMURA, T; SATO, R. (1964b). The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes, II. Solubilization, purification and properties, *J. Biol. Chem.*, 237, 1375-1376.
- PETERSON, JA; EBEL, RE; O'KEEFFE, DH. (1978). Methods in Enzymology, 52, Academic Press, New York.
- PHILLIPS, AH; LANGDON, RG. (1962). Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase: Isolation, characterization, and kinetic studies. *J Biol Chem*, 237:2652-60.
- PINELA, S; QUINTELLA, BR; ALMEIDA, PR; LANÇA, MJ. (2009). Comparison of the fatty acid profile of muscle neutral lipids and phospholipids of up-river anadromous sea lamprey (*Petromyzon marinus* L.) from three Portuguese river basins. *Sc. Mar.*, 73(4): 785-795.
- POLAKOF, S; MÉDALE, F; SKIBA-CASSY, S; CORRAZE, G; PANSEERAT, S. (2010). Molecular regulation of lipid metabolism in liver and muscle of rainbow trout subjected to acute and chronic insulin treatments. *Domestic Animal Endocrinology*, 39, 26-33.
- POSTMA, E; VERDUYN, C; SCHEFFERS, WA; VAN DIJKEN, JP. (1989). Enzymatic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*; 55, 468–77.
- PRABHU, AV; TAMBE, SP; GANDHI, NN; SAWANT, SB; JOSHI, JB. (1999). Rice Bran Lipase: Extraction, Activity, and Stability *Biotechnol. Prog.*, 15, 1083-1089.
- QUINTELLA, BR; DIAS, NM; ALMEIDA, PR. (2001). Efeito das variações de caudal induzidas por aproveitamentos hidroeléctricos, no comportamento migratório da lampreia-marinha (*Petromyzon marinus* L.). In: Actas do 2º Congresso Nacional de Conservação da Natureza. 2-5 de Outubro de 2001. Instituto da Conservação da Natureza, Lisboa.
- RAM, PA; WAXMAN, DJ. (1992) Thyroid hormone stimulation of NADPH P450 reductase expression in liver and extrahepatic tissues. Regulation by multiple mechanisms. *J Biol Chem* 267(5):3294-301.
- ROGADO, L. (COORD.); ALMEIDA, PR; ALVES, J; BOCHECHAS, J; CORTES, R; DOMINGOS, I; FILIPE, F; MADEIRA, J; MAGALHÃES, F. (2005). *Salmo salar* Salmão. In: Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal. Cabral MJ et al. (eds.). Instituto da Conservação da Natureza, Lisboa.

- SARGENT, JR; BELL, MV; HENDERSON, RJ. (1995). *Eur. J. Protistol.* , 31, p. 460
- SARGENT, JR; TOCHER, DR; BELL, JG. (2002). *Fish Nutrition*, Third Edition, Elsevier Science (USA).
- SHERIDAN, MA. (1988). Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comp. Biochem. Physiol.*, 90B: 679-690.
- SHERIDAN, MA; KAO, Y-K. (1998). Regulation of Metamorphosis-Associated Changes in the Lipid Metabolism of Selected Vertebrates, *Amer. Zool.*, 38:350-368.
- SINNHUBER, RO. (1969). The role of fats. In *Fish in research*, edited by O.W. Newhaus and J.E. Halver, New York, Academic Press, pp. 245-61.
- SUGIMOTO, Y; OHTA, Y; MORIKAWA, T; YAMASHITA, T; YOSHIDA, M; TAMAOKI, B-I. (1990). *In vitro* metabolism of testosterone on hepatic tissue of chicken (*Gallus domesticus*), *J. Steroid Biochem.*, 35, 271-279.
- SVENDSEN, A. (2000). Lipase protein engineering. *Biochim Biophys Acta* 1543 (2): 223–228.
- TOCHER, DR; SARGENT, JR. (1987). The effect of calcium ionophore A23187 on the metabolism of arachidonic and eicosapentanoic acids in neutrophils from marine fish rich in n-3 (polyunsaturated fatty acid). *Comp. Biochem. Physiol.B*, 87: 733-739.
- TOCHER, RD. (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev. Fish. Sci.* 11(2), 107-184.
- TONG, L. (2005). Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. *Cell. Mol. Life Sci.* 62 (16): 1784–803. doi:10.1007/s00018-005-5121-4.
- VERGÈRESB, G; WASKELL, L. (1995). Cytochrome b5, its functions, structure and membrane topology; *Biochimie* 77,604-620.
- WAXMAN, DJ; MORRISSEY, JJ; LEBLANC, GA. (1989). Hypophysectomy differentially alters P-450 protein levels and enzyme activities in rat liver: pituitary control of hepatic NADPH cytochrome P-450 reductase. *Mol Pharmacol* 35(4):519-25.
- WEBER, GF; WAXMAN, DJ. (1993). Denitrosation of the anti-cancer drug 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea catalyzed by microsomal glutathione S-transferase and cytochrome P450 monooxygenases, *Arch. Biochem. Biophys.* 307, 369-378.
- WEBSTER, CD; LIM, C. (2002). *Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture* – CABI Publishing.
- WILBERT, HMP; ROELOFS, HMJ. (1997). Effect of long time storage on cytosolic glutathione S-transferase, *Biochem. Biophys. Acta*, 1205, 1-18.
- WILLIAMS, CH; KAMIN, H. (1962). Microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase of liver. *J Biol Chem* 1962, 237:587-95.

## **PÁGINAS DA WEB**

[www.arhalentejo.pt](http://www.arhalentejo.pt) (Instituição da região hidrográfica do centro, acedido em 10-05-2010)

[www.arhcentro.pt](http://www.arhcentro.pt) (Instituição da região hidrográfica do centro, acedido em 10-05-2010)

[www.arhnorte.pt](http://www.arhnorte.pt) (Instituição da região hidrográfica do norte, acedido em 10-05-2010)

[www.commonswikimedia.org/.../gallery1](http://www.commonswikimedia.org/.../gallery1) (Acedido em 12-04-2010)

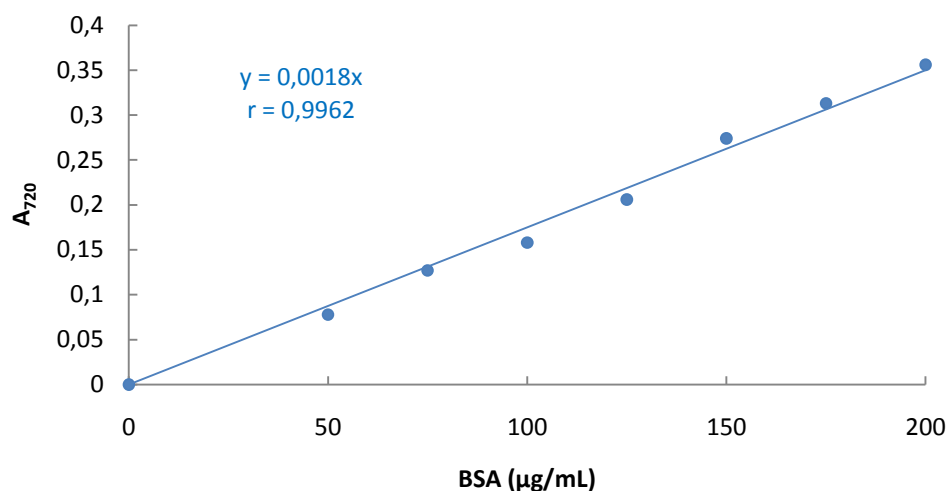
[www.mfpesca.blogspot.com/2009/09/boleia.html](http://www.mfpesca.blogspot.com/2009/09/boleia.html) (Acedido em 12-04-2010)

[www.nbii.gov](http://www.nbii.gov) (Acedido em 12-04-2010)

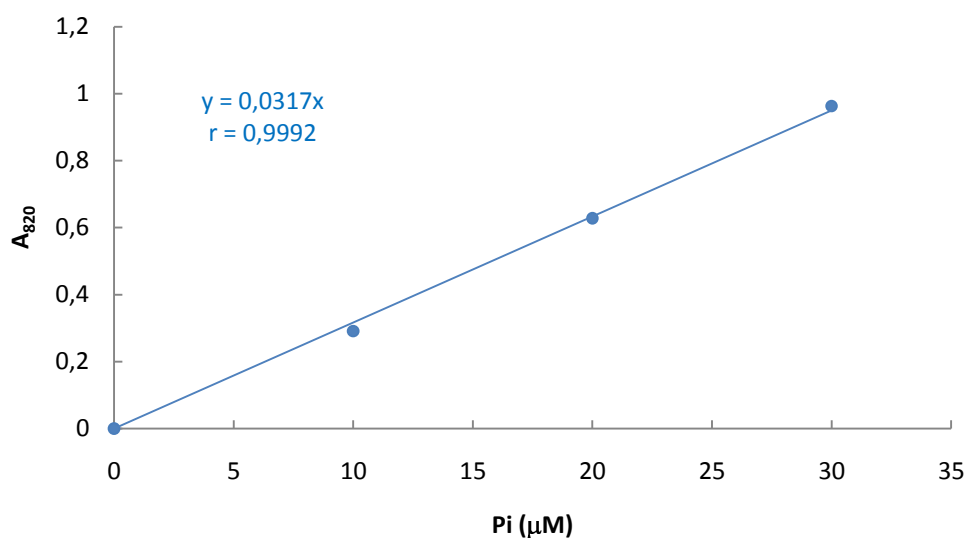
[www.uky.edu/Pharmacy](http://www.uky.edu/Pharmacy) (Acedido em 12-04-2010)

## **Anexos**

## A – Curvas de calibração



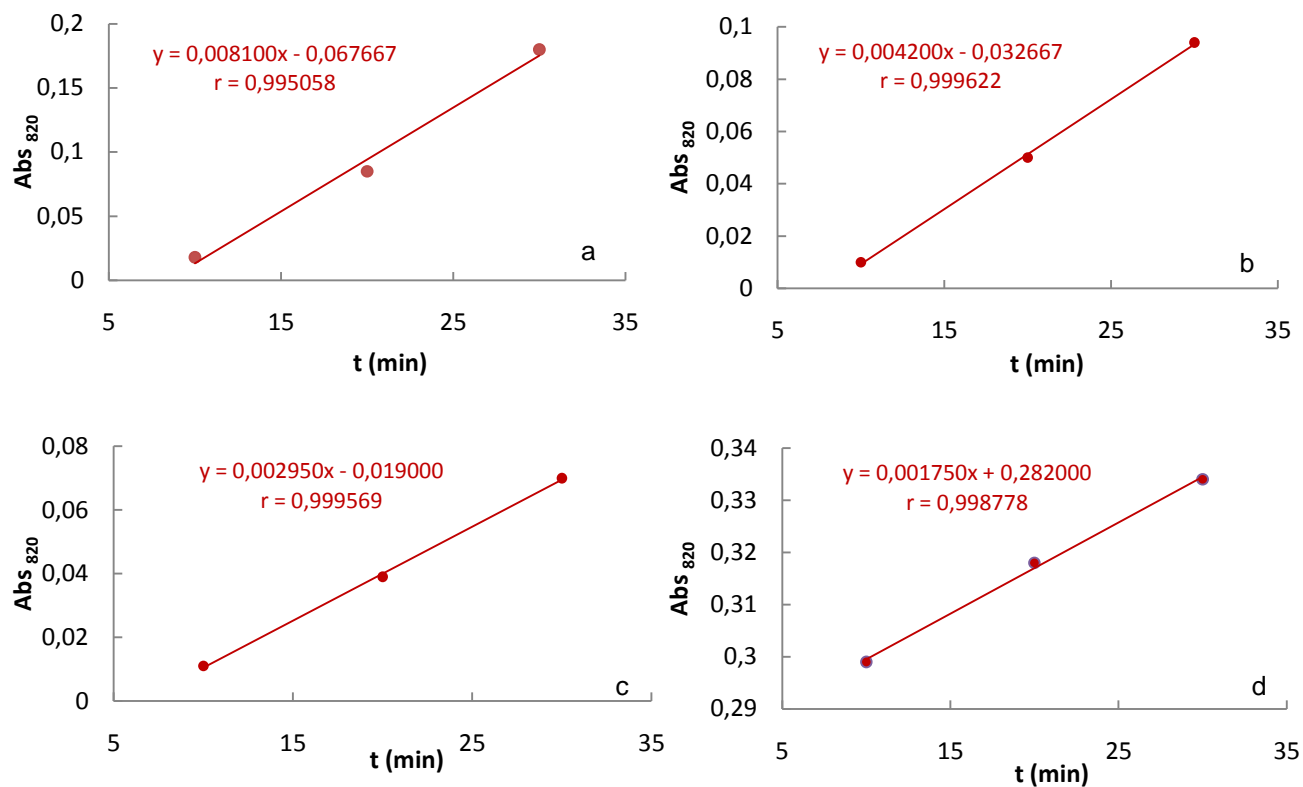
**Figura A1** – Representação gráfica da curva de calibração das proteínas, construída a partir de uma solução de BSA de concentração conhecida como padrão (50-200  $\mu\text{g/mL}$ ).



**Figura A2** – Representação gráfica da curva de calibração de fosfato, construída a partir de uma solução de hidrogenofosfato de sódio de concentração conhecida como padrão.

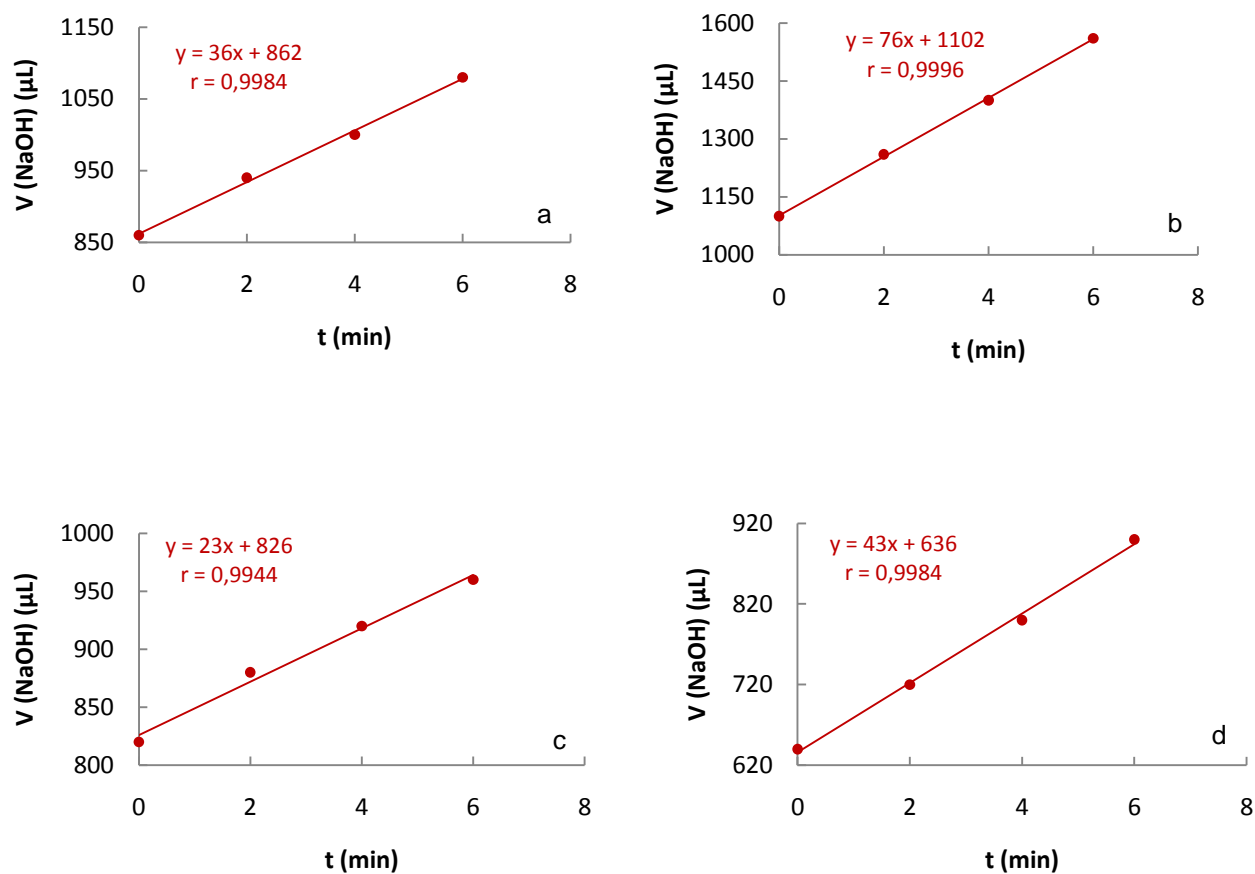


## B – Curvas de reacção ACC



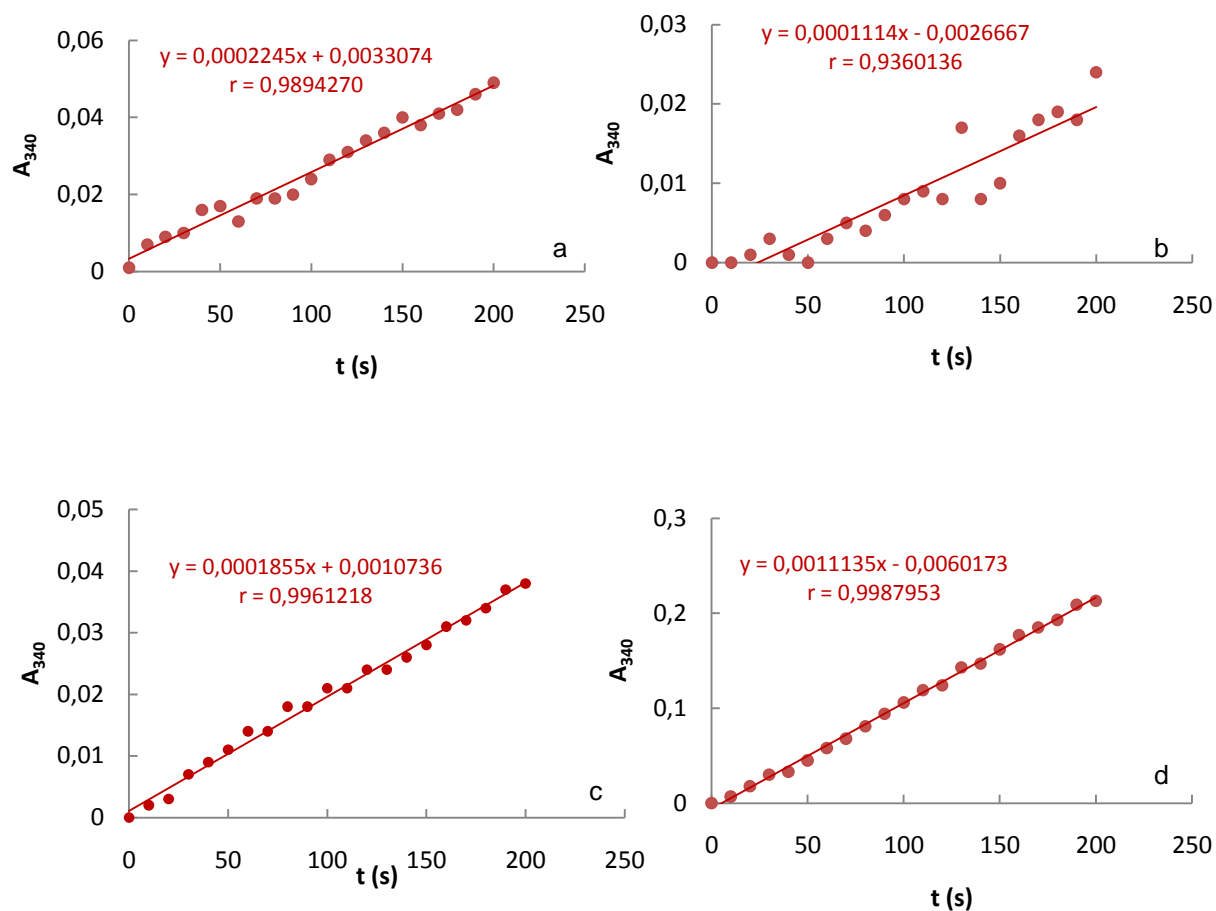
**Figura B1** – Curvas de reacção ACC obtidas para os animais da bacia do Minho (a), Vouga (b), Tejo (c) e Guadiana (d).

## C – Curvas de reacção TGL



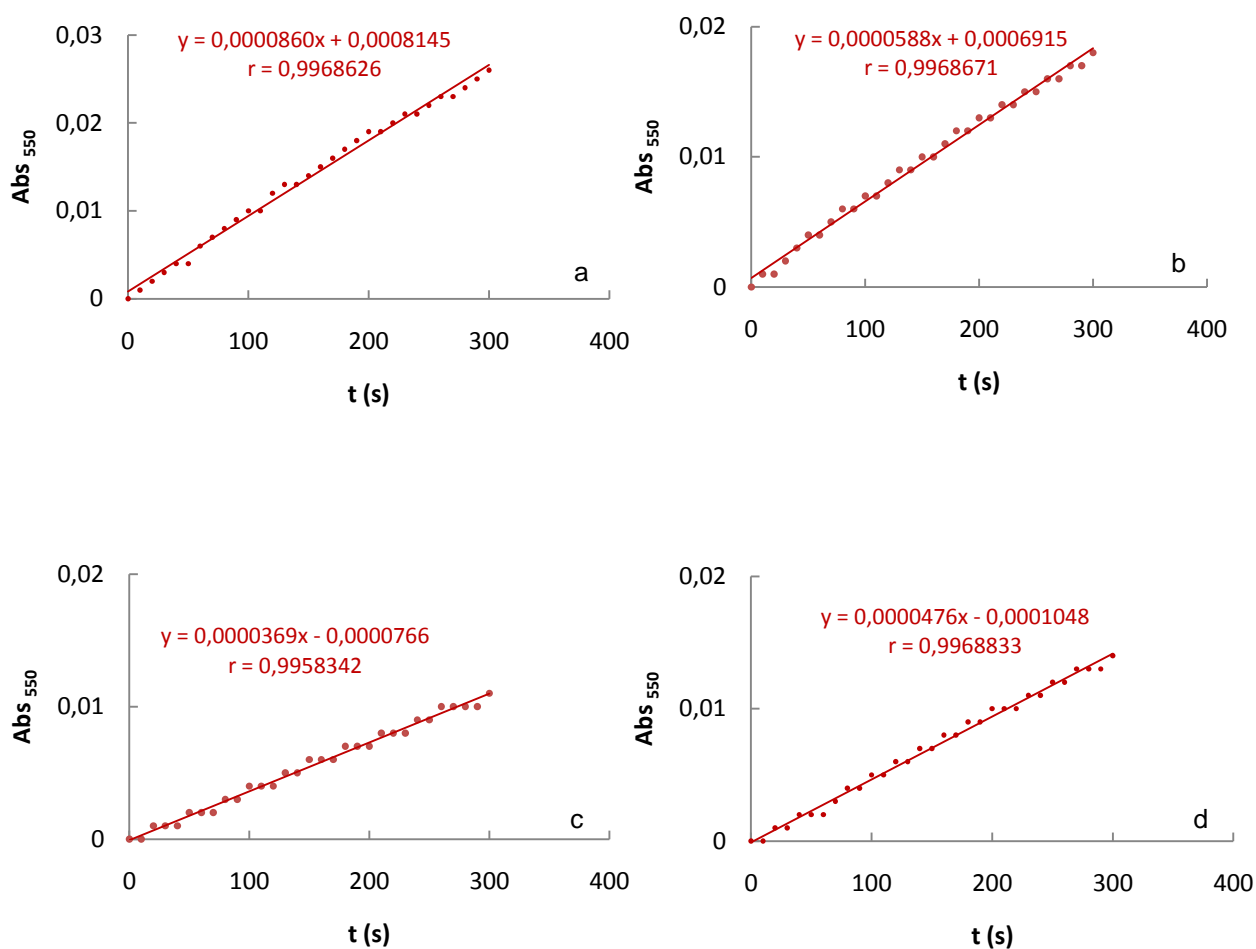
**Figura C1** – Curvas de reacção TGL obtidas para os animais da bacia do Minho (a), Vouga (b), Tejo (c) e Guadiana (d).

## D – Curvas de reacção G6PD



**Figura D1** – Curvas de reacção G6PD obtidas para os animais da bacia do Minho (a), Vouga (b), Tejo (c) e Guadiana (d).

## E – Curvas de reacção CPR



**Figura E1** – Curvas de reacção CPR obtidas para os animais da bacia do Minho (a), Vouga (b), Tejo (c) e Gadiana (d).

## F – Análise Estatística

**Quadro A1** – Análise de variância (ANOVA) do peso total, comprimento, hemo e actividades enzimáticas TGL, ACC, G6PD e CPR ( $p < 0,01$ ).

Caract. biom. ou Activ.Enzimática	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (95%)
PT	Inter-grupos	386086,275	3	128695,425	4,452	,009
	Intra-grupos	1040586,700	36	28905,186		
	Total	1426672,975	39			
CT	Inter-grupos	30010,875	3	10003,625	3,444	,027
	Intra-grupos	104572,000	36	2904,778		
	Total	134582,875	39			
TGL	Inter-grupos	8364131,620	3	2788043,873	35,376	,000
	Intra-grupos	2837243,213	36	78812,311		
	Total	1,120E7	39			
ACC	Inter-grupos	10114,468	3	3371,489	15,748	,000
	Intra-grupos	7707,439	36	214,096		
	Total	17821,907	39			
G6PD	Inter-grupos	7557,544	3	2519,181	14,199	,000
	Intra-grupos	6387,245	36	177,423		
	Total	13944,789	39			
Hemo	Inter-grupos	,126	3	,042	,337	,799
	Intra-grupos	4,486	36	,125		
	Total	4,612	39			
CPR	Inter-grupos	108957,733	3	36319,244	1,124	,352
	Intra-grupos	1162967,236	36	32304,645		
	Total	1271924,969	39			

**Quadro A2** – Análise de variância (ANOVA) das actividades enzimáticas alongases C22:5 $\omega$ 3/C20:5 $\omega$ 3 e C20-22:3 $\omega$ 3/C18:3 $\omega$ 3, alongase/insaturase C22:6 $\omega$ 3/C20:5 $\omega$ 3, bem como, insaturases C16:1 $\omega$ 9/C16:0 e C18:1 $\omega$ 9/C18:0 ( $p < 0,05$ ).

Activ.Enzimática	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (95%)
C16:1 $\omega$ 9/C16:0	Inter-grupos	10,216	7	1,459	9,876	,000
	Intra-grupos	10,640	72	,148		
	Total	20,857	79			
C18:1 $\omega$ 9/C18:0	Inter-grupos	4706,735	7	672,391	2,895	,010
	Intra-grupos	16723,416	72	232,270		
	Total	21430,152	79			
C22:6 $\omega$ 3/C20:5 $\omega$ 3	Inter-grupos	3,815	7	,545	,993	,443
	Intra-grupos	39,514	72	,549		
	Total	43,329	79			
C20-22:3 $\omega$ 3/C18:3 $\omega$ 3	Inter-grupos	3801,319	7	543,046	1,427	,208
	Intra-grupos	27405,573	72	380,633		
	Total	31206,893	79			
C22:5 $\omega$ 3/C20:5 $\omega$ 3	Inter-grupos	3,217	7	,460	2,246	,040
	Intra-grupos	14,729	72	,205		
	Total	17,946	79			